# Zur Kenntnis multipler Formen der RNA Polymerase der Rattenleber

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Bernd-Joachim Benecke
aus Berlin

Marburg/Lahn 1973

Fotodruck E. Symon · 355 Marburg/Lahn · Friedrichstr. 3

# Zur Kenntnis multipler Formen der RNA Polymerase der Rattenleber

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Bernd-Joachim Benecke
aus Berlin

Marburg/Lahn 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 23.11.1973
Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1973
Berichterstatter: Prof.Dr.P. Karlson
Mitberichterstatter: Prof.Dr.H. Kindl

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. K.H. Seifart.

Für seine stets wohlwollende Hilfe
und großzügige Betreuung möchte ich
an dieser Stelle ganz herzlich danken.

Ebenfalls danke ich dem Direktor des
Instituts für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg,
Herrn Prof. Dr. P. Karlson für die
Förderung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Allgemeines | 1 |
| 1.2. | Transkription | 2 |
| 1.3. | Multiple Formen der RNA Polymerase in Eukaryoten | 6 |
| 2. | Material und Methoden | 9 |
| 2.1. | Material | 9 |
| 2.2. | Methoden | 10 |
| 3. | Ergebnisse | 16 |
| 3.1. | Reinigung der RNA Polymerase C | 16 |
| 3.1.1. | DEAE-Zellulose Chromatographie | 16 |
| 3.1.2. | Phosphozellulose Chromatographie | 18 |
| 3.1.3. | Hydroxylapatit Chromatographie | 19 |
| 3.1.4. | DEAE-Sephadex Chromatographie | 20 |
| 3.1.5. | Gelfiltration mit Sephadex G-200 | 22 |
| 3.1.6. | Dichtegradienten-Zentrifugation | 23 |
| 3.1.7. | SDS-Gelelektrophorese | 24 |
| 3.2. | Charakterisierung der Polymerase C | 25 |
| 3.2.1. | Matritzenabhängigkeit | 25 |
| 3.2.2. | Einfluß von $Mn^{++}$,$Mg^{++}$ und Ionenstärke | 25 |
| 3.2.3. | Hemmung durch $\alpha$-Amanitin | 26 |
| 3.2.4. | Beeinflussung durch andere Inhibitoren | 32 |
| 3.2.5. | Verhalten gegen Stimulierenden Faktor | 33 |
| 3.2.6. | Verhalten gegen Antikörper | 33 |
| 3.3. | Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der RNA Polymerase C | 34 |
| 3.3.1. | Einfluß von Cycloheximid | 35 |
| 3.3.2. | Einfluß von Cortisol | 40 |
| 3.3.3. | Einfluß von Teilhepatektomie | 43 |
| 4. | Diskussion | 46 |
| 5. | Zusammenfassung | 52 |
| 6. | Verzeichnis der Abkürzungen | 53 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 54 |

## Einleitung

Für die Untersuchung der molekularen Grundlagen des Wachstums und vor allem der Differenzierung einer Zelle ist der Transkriptionsschritt auf dem Wege der Realisierung genetischer Information von besonderer Bedeutung. An diesem Punkt wird entschieden, welche der in der Basensequenz der DNA festgelegten Informationen zu einem bestimmten Zeitpunkt abgerufen und in eine messenger-RNA überführt wird, eine Transportform, die im Zellplasma als Code für die Aminosäuresequenz der an den Ribosomen synthetisierten Proteine dient. Diese messenger-RNA wird von dem Enzym DNA-abhängige RNA Polymerase (E.C.2.7.7.6.), unter Verwendung der DNA als Matritze, in Form eines komplementären Nukleotidstranges synthetisiert.

Im Gegensatz zu bakteriellen Systemen tritt die RNA Polymerase höherer Organismen in multiplen Formen auf. Da diese Formen der RNA Polymerase möglicherweise für die Transkription verschiedener DNA Abschnitte verantwortlich sind, stellt die Untersuchung dieser multiplen Enzyme einen wichtigen Ansatzpunkt zur Erforschung der Kontrollmechanismen bei höheren Organismen dar.

Es sind in erster Linie zwei Faktoren, die die Untersuchung der Transkription in Eukaryoten erschweren.

1. Bei den zur Verfügung stehenden Systemen handelt es sich meist um Gewebe, die aus stationären Zellen bestehen, d.h. Zellen mit sehr geringer Teilungsfrequenz. Daraus ergibt sich für diese Systeme ein wesentlich langsamerer Informationsfluß, als das zum Beispiel in Bakterien der Fall ist.
2. Da sich in einer Säugetierzelle etwa tausend Mal mehr DNA als in einer Bakterienzelle befindet, ist es viel schwerer, bestimmte Transkriptionsprodukte auf dem Wege zur Realisierung der in ihnen gespeicherten Information zu verfolgen.

Um dennoch einen Einblick in die Mechanismen der Transkription

und deren Steuerung in vielzelligen Organismen zu bekommen, benutzt man die Möglichkeit, alle an dem System beteiligten Komponenten zu isolieren und unter variierenden Bedingungen in vitro zu untersuchen. Obwohl derartige in vitro-Systeme nur bedingt Rückschlüsse auf die Verhältnisse der intakten Zelle zulassen, eröffnet sich hier ein Weg, die Funktion der einzelnen Komponenten und die Möglichkeiten ihrer Beeinflussung zu untersuchen.

Transkription

Formal läßt sich die Transkriptionsreaktion folgendermaßen darstellen:

$$\begin{matrix} n\ ATP \\ n\ UTP \\ n\ GTP \\ n\ CTP \end{matrix} \xrightarrow[DNA,\ Me^{++}]{RNA\ Polymerase} \left[\begin{matrix} AMP \\ | \\ UMP \\ | \\ GMP \\ | \\ CMP \end{matrix}\right]_n + (4n-1)\ PPi$$

5`-Ribonuleosid-triphosphate → RNA + Pyrophosphat

Die Ribonukleotide werden von der RNA Polymerase entsprechend der Nukleotidsequenz der DNA in die wachsende Kette als Monophosphate eingebaut, Pyrophosphat wird freigesetzt.

Die Anwendung spezifischer Inhibitoren, sowie genetische und strukturelle Untersuchungen der RNA Polymerase (1,2) haben es ermöglicht, im Gesamtablauf der Transkription in Bakterien vier Phasen zu unterscheiden:

a. Präinitiation. Das Enzym bildet mit der DNA einen lockeren Komplex. Durch Verlagerung der Polymerase an eine spezifische Bindungsstelle (Promotor) wird unter Mitwirkung eines Initiationsfaktors (sigma) ein stabiler Komplex gebildet, der das erste Nukleotid, meist ein Purin als Base enthaltend, bindet. Dieses 5`-terminale Nukleotid des RNA Stranges bleibt im Gegensatz zu allen folgenden als Triphosphat erhalten.
b. Initiation. Die erste Phosphodiesterbindung wird unter

Abspaltung eines Pyrophosphatrestes zwischen dem ersten und dem zweiten Nukleotid ausgebildet.

c. Elongation. Die RNA Polymerase wandert an der DNA entlang. Jedes neu einzubauende 5`-Nukleosidmonophosphat wird dabei über eine Phosphodiesterbindung mit dem letzten 3`-OH der wachsenden Kette verbunden, sodaß ein RNA Strang entsteht, der in Richtung von 5` nach 3` wächst und dem codogenen DNA Strang gegenläufig ist.

d. Termination. Mehrere Mechanismen sind hier zu unterscheiden. Die Transkriptionsprodukte enden vorwiegend mit Uridin als 3`-terminalem Nukleotid. Vermutlich kann also die Polymerase gewisse Terminationssignale in der Basenfolge der DNA erkennen. Eine weitere Möglichkeit zur spezifischen Beendigung von RNA Ketten ist die Anwesenheit eines Terminationsfaktors rho (3), der zusätzlich an das vollständige Enzym bindet. Darüber hinaus ist eine spezifische Termination, ohne Anwesenheit von Faktoren, unter geeigneten Salzbedingungen beschrieben (4).
Der gebildete RNA Strang wird freigesetzt und das Enzym löst sich von der DNA.

Da für die Matritzenfunktion der DNA die freiliegenden Basen benötigt werden, "schmilzt" der DNA Doppelstrang durch die synthetisierende Polymerase in einem Bereich von ca. 40 Nukleotiden.

Obwohl die genaue Struktur der Chromosomen noch nicht bekannt ist, weiß man seit langem, daß die DNA in der Eukaryotenzelle nicht als isolierte Doppelhelix vorliegt, sondern mit Proteinen einen Komplex bildet, und mehrere Helices zusammen in einer als "super-coil" bezeichneten Überstruktur angeordnet sind. Neuere Ergebnisse zeigen, daß bis zu 60% der DNA mit Proteinen bedeckt ist (5,6). An diesem als Chromatin bezeichneten Desoxyribonukleoprotein-Komplex findet die Transkription statt, wobei angenommen wird, daß die RNA Polymerase nur jene Bereiche der DNA ablesen kann, die nicht von Proteinen bedeckt sind.

Als Produkte der Transkription gibt es in der Zelle im wesentlichen drei RNA-Arten, die sich hinsichtlich ihrer Funktion, ihres Molekulargewichtes und ihrer Basenzusammensetzung unterscheiden.

1. Die ribosomale RNA (rRNA) stellt mit etwa 80% die Hauptmenge der zellulären RNA. Sie ist mit etwa 60% am Aufbau der Ribosomen beteiligt und wird im Nukleolus synthetisiert. Bei Eukaryoten existieren drei rRNA Typen mit Sedimentationskoeffizienten von jeweils 5S, 18S und 28S.
2. Die transfer-RNA (tRNA) macht ca. 15% der gesamten RNA einer Zelle aus und sorgt als Überträger der Aminosäuren für deren richtige Aneinanderreihung bei der Proteinbiosynthese. Die tRNA wird im Kernplasma gebildet. Da etwa 60 verschiedene Typen vorhanden sind, steht für jede Aminosäure mindestens eine spezielle tRNA zur Verfügung. Die verschiedenen tRNA Typen sedimentieren bei ca. 4S.
3. Die messenger-RNA (mRNA) beträgt nur etwa 5% der gesamten RNA Menge. Sie wird extranukleolar am Chromatin des Kernplasmas gebildet und dient, nach dem Transport in das Zytoplasma, bei der Proteinbiosynthese als Matritze für die Aufeinanderfolge der Aminosäuren. Die mRNA Typen, deren Zahl in die Tausende geht, weisen Sedimentationskoeffizienten zwischen 6S und 25S auf.

Während die mRNA lediglich aus den vier klassischen Basen A, U, G und C besteht, enthält die rRNA zusätzlich geringe Mengen sogenannter seltener Basen, bei denen es sich um Derivate der Standardbasen (meist Methylierungsprodukte) handelt. Im Falle der tRNA machen die seltenen Basen bis zu 10% der gesamten Basenmenge aus.

Die Gene sind gleichermaßen in allen Zellen eines Organismus während der ganzen Lebenszeit vorhanden, jedoch wird nur ein Teil in ganz bestimmten Entwicklungsphasen transkribiert. Deshalb muß dieser Vorgang einer strengen Kontrolle unter-

liegen. Grundsätzlich lassen sich hierbei zwei regulatorische Prozesse unterscheiden.

1. Jacob und Monod (7) postulierten 1961 ein Modell für die Regulation der Genaktivität, das in seinen wesentlichen Zügen in den darauffolgenden Jahren für Bakterien bestätigt werden konnte: In seinem funktionellen Zustand hindert ein von einem Regulatorgen gebildetes Repressormolekül die RNA Polymerase, einen bestimmten Genabschnitt zu transkribieren, in dem der Repressor an das Operatorgen bindet und so das gesamte Operon blockiert (negative Kontrolle).
2. 1969 fanden Burgess und Mitarbeiter (2) in E.coli einen regulatorischen Faktor ($\sigma$-factor), der die Initiation der Transkription an spezifischen Stellen der DNA (Promotor) fördert und so ein ursprünglich inaktives Polymerasemolekül zur Transkription bestimmter Gene befähigt (positive Kontrolle).

Einen weiteren Proteinfaktor, durch den die auch als "Rumpfenzym" bezeichnete bakterielle Polymerase modifiziert wird, fand Roberts 1969 (3). Dieser Terminationsfaktor ($\rho$-factor) bewirkt an spezifischen Stellen der Matritze den Kettenabbruch und das Freisetzen der neugebildeten RNA.

Obwohl sich die grundlegenden Mechanismen der Transkription bakterieller und eukaryotischer Systeme zu gleichen scheinen - so beschreibt z.B. Chambon ähnliche Phasen im Gesamtablauf der Transkription in Kalbsthymuskernen (8) - liegt in der Zelle eines höheren Organismus eine sehr viel kompliziertere Situation vor. Ein gutes Beispiel hierfür ist die RNA Polymerase, die im bakteriellen System für die Synthese verschiedenartiger RNA Spezies jeweils modifiziert werden kann, während die höheren Organisationsformen vielzelliger Organismen eine Arbeitsteilung multipler Enzymformen in dem Sinne zu erfordern scheinen, daß unterschiedliche RNA Polymerasemoleküle jeweils nur ganz bestimmte Genabschnitte transkribieren und so eine abgestufte Regulierung der RNA Synthese ermöglichen.

Multiple Formen der RNA Polymerase in Eukaryoten

Für Eukaryoten ist seit längerem bekannt, daß die Eigenschaften der bei der Inkubation von intakten Zellkernen in vitro erhaltenen Transkriptionsprodukte von den bivalenten Kationen $Mg^{++}$ und $Mn^{++}$, sowie den Ionenstärkebedingungen abhängen. Basennachbarschaftsanalysen und Hybridisierungsexperimente mit den in Gegenwart von Magnesium bei niedriger Ionenstärke erhaltenen Produkten wiesen auf eine Ähnlichkeit mit ribosomaler RNA hin, während das in Gegenwart von Mangan bei höherer Ionenstärke gebildete Produkt, der heterogenen Kern-RNA (heterogenous nuclear RNA, hnRNA) zu gleichen schien. Als hnRNA bezeichnet man das direkte Transkriptionsprodukt der DNA des Kernplasmas. Da erst hieraus durch Umwandlung die eigentliche mRNA entsteht, wird heute statt hnRNA die Bezeichnung "pre-message" (prä mRNA) benutzt. Diese verschiedenen Produkte deuteten auf das Vorhandensein von zwei verschiedenen RNA synthetisierenden Enzymen im Zellkern hin. Roeder und Rutter (9) gelang es als ersten, multiple RNA Polymeraseaktivitäten aus den Zellkernen von Seeigeleiern zu isolieren und mit Hilfe von DEAE-Sephadex Chromatographie voneinander zu trennen. Obwohl inzwischen von verschiedenen Laboratorien zum Teil mehrere Formen der RNA Polymerase beschrieben wurden (10), gilt bisher die Existenz zweier Enzyme als gesichert, die sich aufgrund ihres Verhaltens gegenüber α-Amanitin (ein Gift des Knollenblätterpilzes Amanita phalloides) deutlich voneinander unterscheiden lassen (11,12). Diese beiden Polymerasen des Zellkerns, entsprechend der Nomenklatur von Chambon und Mitarbeitern als A und B bezeichnet (11), befinden sich jeweils nur in bestimmten Bereichen des Zellkerns. Während man aus gereinigten Nukleolen lediglich Polymerase A extrahieren kann (13), findet man bei der Untersuchung des Kernplasmas neben geringen Mengen A-Enzym überwiegend Polymerase B.

Bisher ist es nicht gelungen, durch Produktanalysen in vitro einen direkten Beweis für die funktionelle Rolle des jeweiligen Enzyms zu erbringen, da die mit den derzeitigen Methoden isolierbaren Matritzen keineswegs mehr ihre natürliche

Struktur besitzen und daher die Transkription in vitro unspezifisch ist. Das bedeutet, daß diese Produkte der im intakten System gebildeten RNA keineswegs entsprechen und daher Hybridisierungsexperimente zu keinem vergleichbaren Ergebnis führen. Dennoch stützen alle bisher bekannten Daten die Annahme, daß das A-Enzym für die Synthese der ribosomalen RNA sorgt, während Polymerase B für die Synthese der messenger-RNA an der DNA des Kernplasmas verantwortlich ist.

Die beiden RNA Polymerasen des Zellkerns weisen neben ihrem unterschiedlichen chromatographischen Verhalten im wesentlichen folgende Eigenschaften auf:
Übereinstimmend sind beide Enzyme unbedingt Matritzen-abhängig und benötigen alle vier Ribonukleosidtriphosphate, sowie die Anwesenheit bivalenter Kationen zur Synthese. Im Gegensatz zu bakterieller und mitochondrialer Polymerase sind die Kernenzyme der höheren Organismen Rifampicin resistent, werden jedoch durch außerordentlich lipophile halbsynthetische Derivate dieses Antibiotikums gehemmt (8,14,15). Actinomycin D jedoch hemmt durch Blockierung der DNA alle Matritzen-abhängigen RNA Polymerasen (16).
Dagegen ergeben sich folgende Unterschiede:

Polymerase A zeigt maximale Aktivität mit Magnesium, bevorzugt niedrige Ionenstärke, liest Doppelstrang DNA besser als denaturierte DNA und ist gegen α-Amanitin resistent.

Polymerase B bevorzugt zur Synthese die Gegenwart von Mangan bei höherer Ionenstärke und transkribiert Einzelstrang DNA besser als native DNA. Schon sehr geringe α-Amanitin Konzentrationen (0,1 ug/ml) hemmen das B-Enzym vollständig. Ein von Seifart aus dem Zytoplasma von Rattenlebern isolierter (17), dem von Stein und Hausen für Thymus (18) analoger Proteinfaktor stimuliert lediglich Polymerase B. Neuere Ergebnisse zeigen, daß diese Stimulierung hauptsächlich die Elongationsphase der RNA Synthese betrifft (19).

Inzwischen wurde aus der Arbeitsgruppe von Muramatsu ein

weiterer Proteinfaktor beschrieben, der lediglich das A-Enzym stimuliert (20). Dieser Faktor wurde jedoch noch nicht gereinigt und sein Wirkungsmechanismus ist bisher unbekannt.

Kürzlich wurde gezeigt, daß die B-Polymerase des Kalbsthymus und der Rattenleber aus zwei Unterklassen B I und B II bestehen (21), und daß auch das A-Enzym in mehreren solcher Unterklassen vorzukommen scheint (22). Untersuchungen zur Struktur der Kernpolymerasen ergaben, daß beide Enzyme aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind, die zusammen ein Molekulargewicht von etwa 500.000 Dalton ausmachen. Chambon und Mitarbeiter fanden nach Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen für Polymerase A (23) zwei große und vier kleine Untereinheiten (200, 126, 51, 44, 25 und 16.5 x $10^3$ Dalton) und für Polymerase B (24) drei große und drei kleine Ketten (214, 180, 140, 34, 25 und 16.5 x $10^3$ Dalton).

Die spezifische Hemmung des B-Enzyms durch α-Amanitin ist das wichtigste Unterscheidungsmerkmal beider RNA Polymerasen des Zellkerns und wurde zuerst für Rattenleber von Seifart und Sekeris (12) und für Kalbsthymus von Chambon und Mitarb. (11) beschrieben. Diese Ergebnisse wurden inzwischen für eine große Zahl anderer Gewebe bestätigt (10).

Neben den RNA Polymerasen des Zellkerns existiert in den Mitochondrien der Eukaryotenzelle eine weitere RNA Polymerase (25). Dieses Enzym ist im Gegensatz zu den Kernpolymerasen Rifampicin sensitiv und besitzt ein wesentlich geringeres Molekulargewicht von etwa 65.000 Dalton (25,26).

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung einer neuen, im Zytoplasma von Rattenlebern vorkommenden DNA-abhängigen RNA Polymerase beschrieben. Durch vergleichende Untersuchungen konnte diese, aus dem partikelfreien Zellplasma isolierte Aktivität als eigenständiges Enzym gegenüber den drei vorgenannten RNA Polymerasen abgegrenzt werden. In Anlehnung an die Bezeichnungen A und B für die Kernenzyme, wurde dieses Enzym Polymerase C genannt.

## Material und Methoden

### Material

Ausgangsmaterial für die Isolierung der Polymerase C waren die Lebern von 120 bis 200 Gramm schweren männlichen Wistar BR II Ratten, die von der Tierzüchterei Brünger (Halle/Westf.) bezogen wurden.

Von Herrn Prof.Dr.Th. Wieland (Heidelberg) wurden freundlicherweise α-Amanitin und [$^{14}$C]-γ-Methyl-Amanitin zur Verfügung gestellt. Cortisol war eine Gabe der Firma Schering AG (Berlin). Rifampicin und seine Derivate wurden von Prof. L.Silvestri (Gruppo Lepetit,Milano) erhalten. [$^{3}$H]-UTP (1-5 Ci/mMol), L-[$^{14}$C]-Tyrosin (30 Ci/mMol) und [$^{3}$H]-Orotsäure (26.4 Ci/mMol) wurden von The Radiochemical Center (Amersham) bezogen; Nukleosidtriphosphate, Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase von Boehringer(Mannheim); DEAE- (DE 32, 1meq/g) und Phosphozellulose- (P 11, 7meq/g) Ionenaustauscher von Whatman (London); Hydroxylapatit von Clarkson Chem. Co. (Williamsport,USA); DEAE-Sephadex, Sephadex G 75 und G 200 von Pharmacia (Uppsala) und Kalbsthymus DNA von Calbiochem (Los Angeles). Actinomycin D, Cycloheximid (Actidion) und Material für Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden von Serva (Heidelberg) erhalten. Alle anderen Chemikalien waren handelsübliche pro-analysi Substanzen der Firma Merck (Darmstadt).

Puffer:

Puffer I (TSS-Puffer, isotonischer Sucrose Puffer): 0.05 M Tris-HCl,ph 7.5, 0.25 M Saccharose, 0.01 M $MgCl_2$, 0.025 M KCl

Puffer II (Polymerase-Puffer): 0.05 M Tris-HCl, ph 7.9, 0.25 mM EDTA, 5 mM ß-Mercaptoäthanol, 20% Glyzerin

Puffer III (Extraktionspuffer): wie Puffer II jedoch mit Zusatz von 1.0 M $(NH_4)_2SO_4$

Puffer IV (Phosphat-Puffer): 0.01 M Na-Phosphat, ph 6.8, 0.25 mM EDTA, 5 mM ß-Mercaptoäthanol, 20% Glyzerin

Methoden

Präparation von Zytoplasmaextrakt und Zellkernen

Die Präparation von Zellkernen und anschließende Extraktion der Kernpolymerasen waren erforderlich, um in Parallelläufen das chromatographische Verhalten der Polymerase C im Vergleich zu den Kernenzymen untersuchen zu können.

Alle Schritte der Isolierung und Reinigung der RNA Polymerasen wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei einer Temperatur zwischen 2-4 $^{o}$C durchgeführt.

Zur Entnahme der Lebern wurden die Ratten durch cervikale Dislokation getötet und anschließend die Eingeweide freigelegt. Die Lebern wurden in situ mit 10 ml eiskaltem TSS-Puffer,der durch die Pfortader eingespritzt wurde, gespült, danach herausgenommen, mit einer Schere zerkleinert und in einem Glas-Teflon-Homogenisator (jeweils etwa 5 g Leber in 30 ml TSS-Puffer) homogenisiert. Dieses grobe Homogenat wurde entsprechend dem Schema der Abbildung 1 aufgearbeitet.

Durch Zentrifugation für 7 Minuten bei 1000 x g wurden die Zellkerne sedimentiert und vom Zytoplasma grob abgetrennt. Der zytoplasmatische Überstand wurde für 30 Minuten bei 48.000 x g zur Abtrennung der Mitochondrienfraktion zentrifugiert und anschließend im SW 41 Rotor der Beckman $L_2$-65 Zentrifuge 2 Stunden bei 180.000 x g ultrazentrifugiert. Nach dem Absaugen der flotierten Lipide diente dieser partikelfreie zytoplasmatische Überstand als Ausgangsmaterial für die Reinigung der Polymerase C.

Die sedimentierten Zellkerne wurden in 10 Volumen TSS-Puffer, der Sucrose enthielt (2,2 M), suspendiert und entsprechend der Methode von Chauveau (27) durch ein Kissen des gleichen Mediums (10 ml) im 30er Rotor (Beckman) 2 Stunden bei 95.000 x g zentrifugiert. Die gereinigten Kerne wurden direkt für die Extraktion der Kernpolymerasen verwendet.

Extraktion der Zellkerne

Kerne von 100 g Leber wurden in 140 ml Extraktionspuffer suspendiert, 90 Sekunden beschallt (Branson Sonifier,125 Watt)

und anschließend 1.5 Stunden gerührt. Durch den hypertonischen

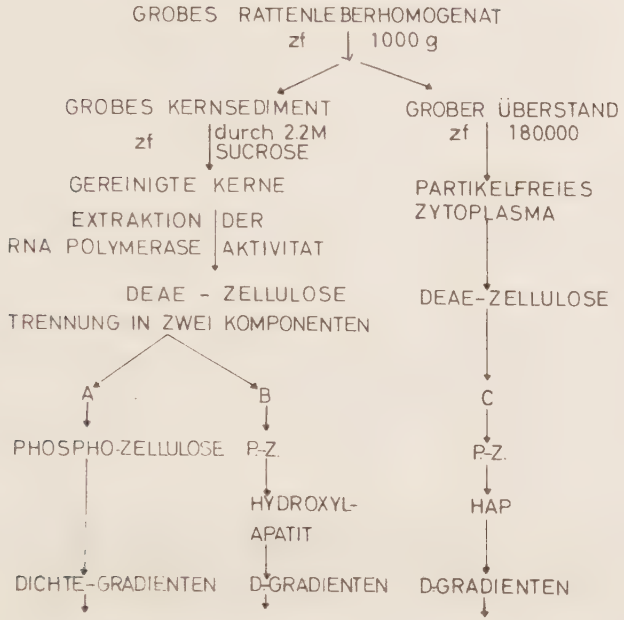


Abb.1 Schematische Darstellung der Extraktion und Reinigung multipler Formen der Rattenleber RNA Polymerase.

Extraktionspuffer und die Ultraschall-Behandlung wurden die verbliebenen intakten Strukturen der Kerne weitgehend zerstört. Außerdem wurde durch die Beschallung die Molekülgröße der DNA stark reduziert und damit ihre Löslichkeit verbessert. Danach wurden die Proteine mit Ammoniumsulfat (3.3 g/100 ml) gefällt, während der größte Teil der DNA, aufgrund der stark polaren sekundären Phosphatgruppen, bei dieser Erhöhung der Salzkonzentration in Lösung blieb und so von den Proteinen abgetrennt werden konnte. Die nach Zentrifugation im SW 41 Rotor nach 1.5 Stunden (36.000 rpm) erhaltenen Proteinsedimente wurden in Polymerase-Puffer

suspendiert und gegen den gleichen Puffer 8 Stunden dialysiert, um die Ionenstärke so weit zu senken, daß der größte Teil der Proteine wieder in Lösung ging. Die nicht wieder gelösten Proteine wurden durch Zentrifugation (12.000 x g, 15 Min.) abgetrennt und die Proteinlösung zur Chromatographie verwendet.

Aktivitätstest für RNA Polymerase

Die RNA Polymeraseaktivität wurde in einem enzymatischen Test gemessen. Der Testansatz enthielt neben der Enzymfraktion in einem Gesamtvolumen von 150 ul folgende Bestandteile : Jeweils 0.2 uMol ATP, GTP und CTP; 0.002 uMol UTP; 1.0 uCi [$^3$H]-UTP; 1.5 uMol Kreatinphosphat; 5 ug Kreatinphosphokinase; 1.5 uMol ß-Mercaptoäthanol; 10 uMol Tris-HCl, ph 7.9; 20 ug DNA; 0.5 uMol $MnSO_4$ und 10 uMol $(NH_4)_2SO_4$ (ergibt eine Ionenstärke von 0.2).
Sollte in Funktionstests die Aktivität der Polymerase A bestimmt werden, wurde in diesen Fällen kein $(NH_4)_2SO_4$ zugesetzt, denaturierte DNA durch native DNA und $MnSO_4$ durch 3.0 uMol $MgSO_4$ ersetzt, da dies die optimalen Synthese-bedingungen des A-Enzyms sind. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37 $^oC$ wurde ein Aliquot von 120 ul auf ein Filterplättchen (16 $cm^2$, Schleicher und Schuell 2043 b) pipettiert und, wie von Seifart beschrieben (28), in 5%-iger eiskalter Trichlor-essigsäure (TCA) praezipitiert. Die Behandlung mit TCA wurde vier mal wiederholt und die Plättchen anschließend mit Methanol und Aether gewaschen. Die Einbaurate von markierten Nukleotiden wurde radiochemisch in einem Flüssigkeit-Szintillationssystem (5 g PPO und 200 mg POPOP in 1 L Toluol) gezählt.

Säulenchromatographie

Die Ionenaustauscher wurden vor jeder Chromatographie regeneriert. Durch Behandlung mit 0.5 n HCl und 0.5 n NaOH und gründlichem Waschen wurden die funktionellen Gruppen des Austauschers von Proteinen und Salzen befreit. Der Ionenaustauscher oder anderenfalls die Gelmatrix wurden mit

dem für die Chromatographie vorgesehenen Puffer äquilibriert und anschließend gleichmäßig in ein Chromatographierohr gefüllt. Die gepackte Säule wurde mit mehreren Volumen des gleichen Puffermediums gewaschen, dann mit der Probe beladen und mit mehreren Säulenvolumen Puffer nachgewaschen. Im Falle der Ionenaustauschchromatographie wurden die Säulen mit einem linearen Salzgradienten, bei der Gelfiltration mit Puffer eluiert. Der Verlauf der Salzgradienten wurde entweder durch Titration (Chlorid Gradienten mit 0.01 n $AgNO_3$, $FeCl_3$ als Indikator) oder, im Falle von Phosphatgradienten, durch Leitfähigkeitsmessung bestimmt.
Das Säuleneluat wurde in einem Fraktionssammler (LKB, Schweden) fraktioniert. Gleichzeitig wurde ein UV-Absorptionsprofil aufgezeichnet. Elutionsmittel und Flußraten sind in den Beschreibungen der jeweiligen Abbildungen angegeben.

Gradientenzentrifugation

Glyzerindichtegradienten wurden durch Mischen von Polymerase-Puffer mit unterschiedlicher Glyzerinkonzentration hergestellt. Polymerase-Puffer mit 40% Glyzerin und Polymerase-Puffer mit 15% Glyzerin wurden aus einer Mischkammer so in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt, daß die Dichte der gegossenen Flüssigkeitssäule vom Boden zur Spitze linear abnahm. Nach dem Überschichten der Probelösung und Zentrifugation wurde der Gradient durch eine Sonde vom Boden des Röhrchens abgesaugt (peristaltische Pumpe Varioperpex, LKB) und von Hand fraktioniert.

SDS-Gelelektrophorese

Die Gelmischungen wurden in Glasröhrchen von 6 mm lichter Weite zu einer Schichtdicke von 65 mm eingefüllt und polymerisiert.
Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde mit 5%-igen Polyacrylamid Gelen mit Zusatz von SDS entsprechend der Methode von Weber und Osborn (29) durchgeführt. Um die Proben in ihre Untereinheiten zu zerlegen, wurden sie mit 1% SDS für 8 Stunden bei 60 $^{o}$C inkubiert. 250 ul des

Inkubats wurden direkt aufgetragen; die Elektrophoresezeit betrug 6 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 6 mA pro Gel. Nach dem Herausnehmen wurden die Gele 2 Stunden in 0.25% Coomassie Brillantblau, 40% Methanol und 7.5% Essigsäure gefärbt. Die Entfärbung wurde mit 20% Methanol und 7.5% Essigsäure durchgeführt und dauerte bis zu 2 Tagen.

Proteinbestimmung

a. Fällungsmethode nach Luck (30).
Die Probe wurde mit einem gleichen Volumen 2.2 M Trichloressigsäure praezipitiert. Nach 15 Minuten wurde die Trübung bei einer Wellenlänge von 400 nm gemessen.

b. Methode nach Lowry (31).
Die Probe wurde mit $H_2O$ auf 1.0 ml aufgefüllt. Dazu wurden 2.5 ml einer Mischung aus 50 Teilen 2% $Na_2CO_3$ in 0.1 n NaOH und 1 Teil 0.5% $CuSO_4$ x 5 $H_2O$ in 1% Na-Tartrat-Lsg. gegeben. Nach 30 Minuten wurde dieser Ansatz mit 0.25 ml Folins-Reagenz/$H_2O$ 1:1 (Folin-Ciucalteus-Phenol-Reagenz,OP Merck), ph 7.0 versetzt und sofort umgeschüttelt. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Extinktion bei 660 nm abgelesen und die Proteinkonzentration an Hand einer Eichkurve ermittelt.

DNA Bestimmung nach Burton (32)

1 ml Probe wurde mit 4.0 ml $H_2O$ (kalt) versetzt und anschließend mit 2.5 ml 0.6 M Perchlorsäure gefällt. Nach 10 Minuten wurde in der Kälte abzentrifugiert (2500 rpm,10 Min.) und das Sediment 2 mal mit 5.0 ml 0.2 M Perchlorsäure gewaschen. Das gewaschene Sediment wurde mit 4.0 ml 0.3 n KOH 1 Stunde bei 37 °C hydrolysiert. Anschließend wurde die Probe abgekühlt und mit 1.2 M kalter Perchlorsäure praezipitiert. Nach 10 Minuten wurde zentrifugiert (2500 rpm, 10 Min.) und das Sediment mit 2.0 ml PCA versetzt, und für 15 Minuten bei 70 °C hydrolysiert (fertige Probe).

Diphenylamin-Reagenz: 1.5 g Diphenylamin + 100 ml Essigsäure 98% + 1.5 ml $H_2SO_4$ kz.
Verdünnter Acetaldehyd: 50 ul Acetaldehyd + 2.5 ml $H_2O$
20 ml Diphenylamin-Reagenz wurden mit 0.1 ml verdünntem Acetaldehyd gemischt.
1.0 ml Probe wurde mit 2.0 ml Mischung versetzt und 16 Std. stehen gelassen. Danach wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen und die DNA Konzentration nach einer Eichkurve bestimmt.

In vivo Applikation von Wirkstoffen

Die Inhibitor- oder Hormonlösungen wurden den Tieren durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Kontrolltiere bekamen ein gleiches Volumen Tris-Puffer (10 mM, ph 7.9) injiziert.

Herstellung von denaturierter DNA

Einzelsträngige DNA wurde durch Erhitzen von nativer DNA (2 mg/ml) für 5 Minuten im siedenden Wasserbad und sofortigem Abkühlen der Lösung im Eisbad hergestellt.

## Ergebnisse

### Reinigung der RNA Polymerase C

Der mit der beschriebenen Methode gewonnene partikelfreie zytoplasmatische Extrakt wurde mit Glyzerin zu einer Endkonzentration von 20% versetzt, mit 1 n NaOH auf ph 7.9 titriert und mit Polymerase-Puffer zu einer maximalen Leitfähigkeit von 1.5 mS verdünnt. Anschließend wurde die

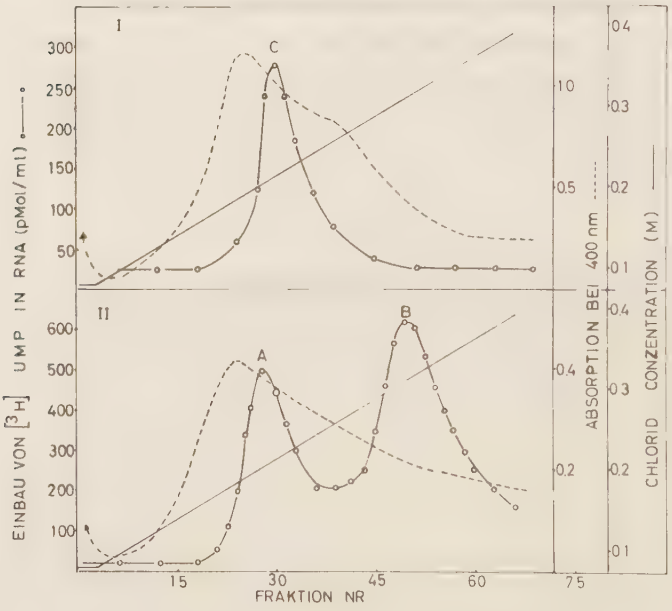


Abb.2. DEAE-Zellulose Chromatographie des Zytoplasmas auf einer 4x18 cm Säule (Teil I) und des Kernextrakts auf einer 2.5x13 cm Säule (Teil II). Die Elution erfolgte mittels eines linearen Salzgradienten ( 500 + 500 ml; 0.0 auf 0.4 M $NH_4Cl$ in Polymerase-Puffer). Die Flußrate betrug 60 ml/Std.;Fraktionen zu 8.0 ml wurden gesammelt. Die Proteinbestimmung (Absorption bei 400 nm) wurde wie beschrieben durchgeführt.

Lösung auf eine DEAE-Zellulose Säule aufgetragen und nach dem Waschen mit einem linearen $NH_4Cl$ Gradienten in Polymerase-Puffer eluiert.

Abbildung 2 zeigt das Elutionsprofil der zytoplasmatischen Polymeraseaktivität von DEAE-Zellulose (I) im Vergleich zu demjenigen eines Kernextraktes (II). Während die Polymerase des Zellplasmas als einzelner Aktivitätsgipfel auftrat, der bei einer Molarität von 0.22 M Cl` eluierte und als Polymerase C bezeichnet wurde, wurde die Polymeraseaktivität des Kernextraktes an diesem Austauscher in zwei Komponenten aufgetrennt, A und B, die jeweils bei 0.20 und 0.30 M Cl` eluierten. Die Elutionspunkte für A und C lagen dicht zusammen und machten eine Differenzierung dieser beiden Enzyme an DEAE-Zellulose unmöglich; dagegen wurde in den Elutionsfraktionen des Zytoplasmas keine Aktivität in dem der Polymerase B entsprechenden Bereich gefunden.

Zur weiteren Reinigung wurde der aktive Bereich der zytoplasmatischen Polymerase (Fraktionen 25-37) vereinigt und mit Polymerase-Puffer zu einer maximalen Chloridkonzentration von 0.18 M verdünnt. Die Enzymlösung wurde dann an eine Phosphozellulose Säule adsorbiert, gewaschen und mit einem linearen $NH_4Cl$ Gradienten eluiert.

Abbildung 3 zeigt in Teil I das Elutionsprofil der Polymerase C von Phosphozellulose. Parallel dazu wurden die von DEAE-Zellulose erhaltenen Enzymaktivitäten der Kernenzyme, nach gleicher Behandlung wie Polymerase C, auf identische Phosphozellulose Säulen aufgetragen, gewaschen und unter denselben Bedingungen eluiert.

Alle drei Polymerasen eluierten als einheitlicher Aktivitätsgipfel in der Reihenfolge C : B : A, entsprechend den Elutionspunkten 0.33, 0.35 und 0.42 M Cl`. Während C und A hier deutlich voneinander getrennt eluierten, konnten die sehr geringen Unterschiede im Elutionsverhalten der Enzyme C und B an Phosphozellulose durch Vergleichschromatographie beider Aktivitäten an Hydroxylapatit erhärtet werden, wo bisher keine Möglichkeit gefunden wurde, Polymerase A sauber

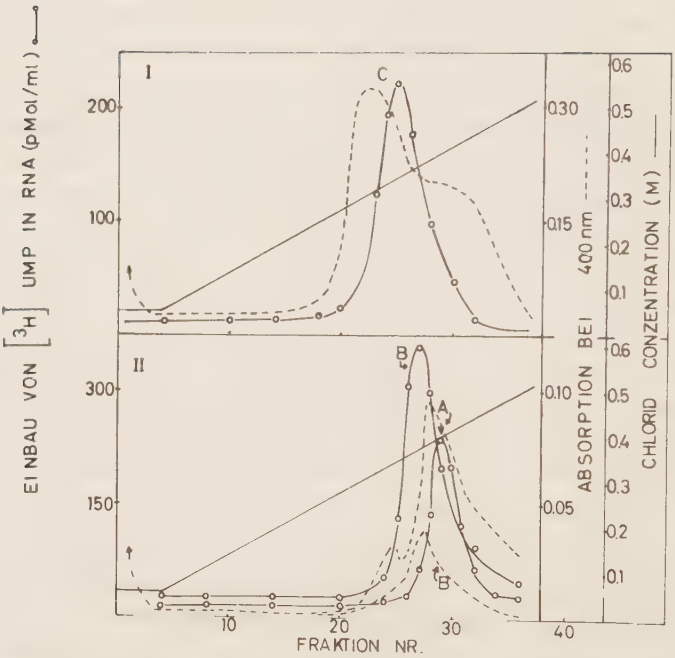


Abb.3. Phosphozellulose Vergleichschromatographie der von DEAE erhaltenen Enzyme A, B und C auf identischen 2.5x10 cm Säulen. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten (350 + 350 ml; 0.0 auf 0.6 M $NH_4Cl$ in Polymerase-Puffer) mit einer Flußrate von 30 ml/Std. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden gleiche Säulen mit derselben Austauscher-Charge gefüllt und unter identischen Bedingungen von einer Pumpe (mit mehreren Ausgängen) mit derselben Gradientenflüssigkeit eluiert.

zu chromatographieren, da dieses Enzym im Verlauf der Chromatographie entweder weitgehend inaktiviert wurde oder durch uneinheitliche Desorption als breite, wenig aktive Zone eluierte. Für die Chromatographie an Hydroxylapatit wurden die Enzymlösungen von C und B vier Stunden gegen Phosphatpuffer dialysiert, anschließend auf zwei identische Säulen aufgetragen, gewaschen und unter denselben Bedingungen

parallel mit einem linearen Natrium-Phosphat Gradienten eluiert. Bevor die Aktivitätsbestimmung durchgeführt werden konnte, mußten die Fraktionen zunächst 8 Stunden gegen Polymerase-Puffer dialysiert werden, da die RNA Polymerase durch die Anwesenheit von Phosphat-Ionen stark gehemmt wird (33).

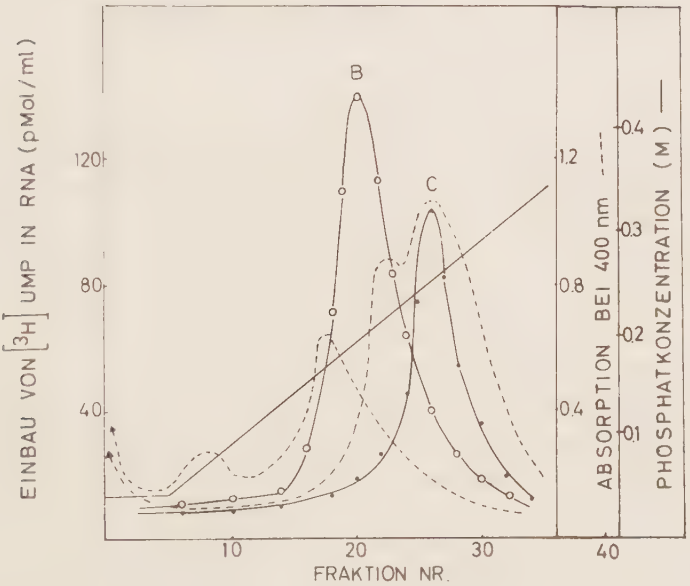


Abb.4. Vergleichschromatographie der (von Phosphozellulose erhaltenen) Enzyme B und C an identischen 2.0x5.5 cm Hydroxylapatit Säulen. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten (50 + 50 ml; 0.0 auf 0.4 M Natrium-Phosphat in Phosphat-Puffer) mit einer Flußrate von 15 ml pro Stunde. Fraktionen zu 3.0 ml wurden gesammelt. Die gleichen Maßnahmen, die in Abb.3 beschrieben sind, wurden beachtet, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

Abbildung 4 zeigt die Profile beider Polymerasen an diesem Austauscher mit der Elutionsreihenfolge B : C und den Elutionspunkten 0.20 und 0.26 M Phosphat.

Zur weiteren Reinigung wurden die aktiven Fraktionen der Polymerase C vereinigt, auf eine DEAE-Sephadex A-25 Säule aufgetragen und mit einem linearen $NH_4Cl$ Gradienten in Polymerase-Puffer eluiert. Das Elutionsprofil zeigte zwei Aktivitätsgipfel, die einer Molarität von 0.18 und 0.32 M $Cl^-$ entsprachen (s.Abb.5).

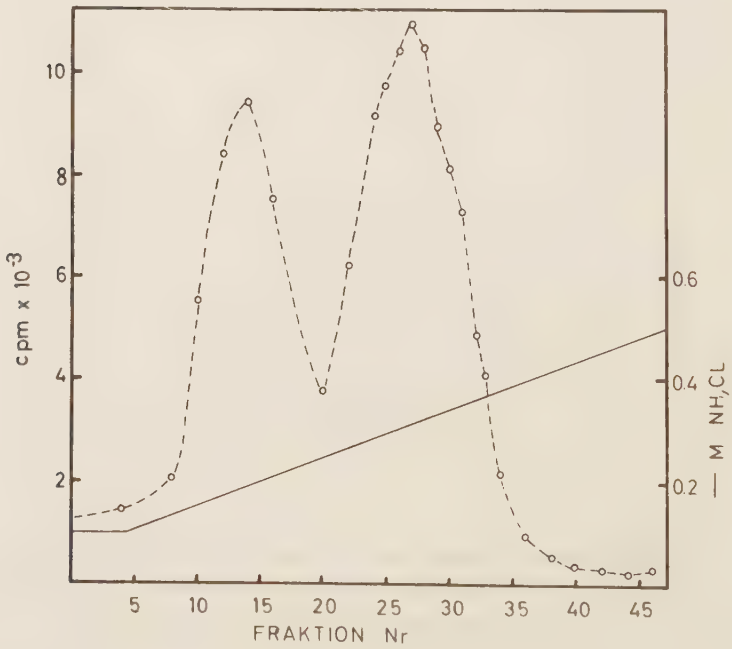


Abb.5. DEAE-Sephadex A-25 Chromatographie der Polymerase C (nach Hydroxylapatit) an einer 1.5x16 cm Säule. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten (80 + 80 ml; 0.0 auf 0.5 M $NH_4Cl$ in Polymerase-Puffer) mit einer Flußrate von 10 ml/Std. Fraktionen zu 3.7 ml wurden gesammelt.

Die Auswertung mehrerer Chromatographien zeigte, daß der erste Gipfel in seiner Aktivität sehr variierte. Zur Klärung, ob an DEAE-Sephadex eine Aufspaltung der zytoplasmatischen Enzymaktivität in zwei Komponenten erfolgte, wurden mit beiden Aktivitätsbereichen vergleichende Funktionstests durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten eindeutig, daß beide Aktivitäten identisch waren. Wahrscheinlich ist dieses zweigipfelige Auftreten des Enzyms auf eine Überladung der Säule zurückzuführen.

Da die bisherigen Trennverfahren überwiegend die Ladung der Proteine berücksichtigten, sollte die weitere Reinigung des Enzyms nach Kriterien der Molekülgröße erfolgen. Hierfür stehen vor allem zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die unterschiedliche Vorzüge besitzen.

1. Gelfiltration über Sephadex Säulen
2. Dichtegradientenzentrifugation

Während der Vorteil der Gelfiltration darin besteht, daß, entsprechend der Säulengröße, auch größere Volumen eingesetzt werden können, erreicht man durch Gradientenzentrifugation eine schärfere Abtrennung, vor allem der niedermolekularen Proteine.

Für die Gelfiltration wurde durch Dialyse in 80% Glyzerin ein Teil der Enzymlösung auf das halbe Volumen konzentriert und anschließend 50 ml auf eine 2.5x150 cm Sephadex G-200 Säule aufgetragen. Die Elution (mit Polymerase-Puffer) erfolgte durch hydrostatischen Druck mit einer Geschwindigkeit von 7.0 ml pro Stunde, eingestellt durch eine Niveau-Differenz von ca. 10 cm.

Abbildung 6 zeigt das Elutionsprofil dieser Gelfiltration. Aus einer Eichung der Säule mit einem Gemisch aus Hämoglobin und Dextranblau konnte ersehen werden, daß die Aktivität mit dem Ausschlußvolumen der Säule erschienen war, was einem Molekulargewicht größer als 200.000 Dalton entsprach.

Zur zusätzlichen Bestimmung des genaueren Molekulargewichts durch Dichtegradienten-Zentrifugation,wurde die Enzymlösung

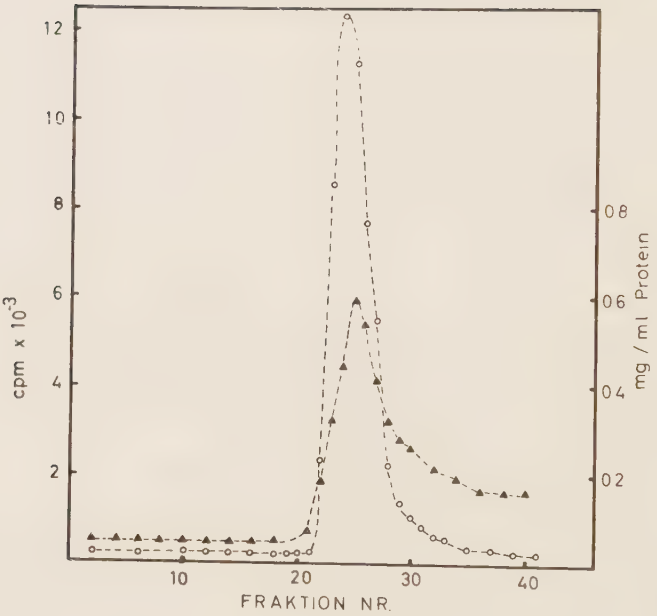


Abb.6. Gelfiltration der Polymerase C (nach DEAE-Sephadex) mit Sephadex G-200. Die Säule (2.5x150 cm) wurde mit Polymerase-Puffer eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde durch eine Niveau-Differenz von ca. 10 cm auf 7.0 ml pro Stunde eingestellt. (o---o) Einbau von $[^3H]$UTP; (▲---▲) mg/ml Protein.

mittels einer 2.0 ml Phosphozellulose Säule 12 : 1 konzentriert und anschließend gegen Polymerase-Puffer, jedoch mit 10% Glyzerin und Zusatz von 80 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 Stunden dialysiert. Danach wurden jeweils 1.2 ml Konzentrat auf Glyzeringradienten (15% auf 40% Glyzerin in Polymerase-Puffer + 80 mM $(NH_4)_2SO_4$ ) aufgetragen und im SW 41 Rotor der Beckman $L_2$-65 Zentrifuge 12 Stunden bei 36.000 rpm zentrifugiert. Die Gradienten wurden, wie unter Methoden beschrieben, zu 400 ul Fraktionen gesammelt.

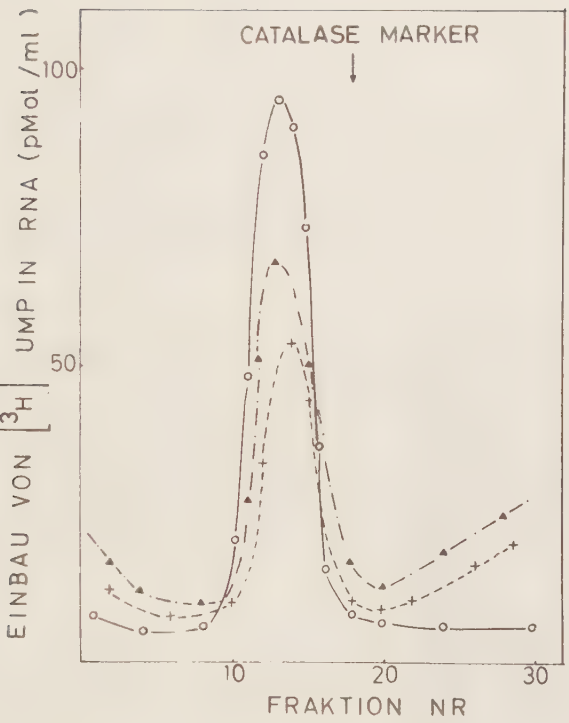


Abb.7. Dichtegradientenzentrifugation der Enzyme A (nach Phosphozellulose), B und C (jeweils nach Hydroxylapatit). 1.2 ml Enzymlösung wurden jeweils auf einen linearen 15% auf 40% Glyzeringradienten in Polymerase-Puffer mit Zusatz von 80 mM $(NH_4)_2SO_4$ aufgetragen. Die Gradienten wurden 12 Stunden bei 36.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 400 ul-Fraktionen gesammelt. (+---+) Polymerase A; (o---o) Polymerase B; (▲-.-.-▲) Polymerase C.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis, wonach sich unter Berücksichtigung der mitgelaufenen Vergleichssubstanzen (Polymerase B, Katalase) für Polymerase C in Übereinstimmung mit den Polymerasen A und B ein Molekulargewicht von ungefähr

500.000 Dalton ergibt.

Als Ergebnis des Reinigungsverfahrens wurde angestrebt, die Untereinheiten der Polymerase C durch Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen darzustellen und möglicherweise Übereinstimmungen mit den Proteinketten der Kernpolymerasen zu zeigen. Daher wurde eine SDS-Gelelektrophorese der Gipfelfraktion des Gradienten (s.Abb.7) auf 5%-igen Gelen durchgeführt. Als Ergebnis dieser Elektrophorese wurden etwa 15 Proteinbanden dargestellt (s.Abb.8).

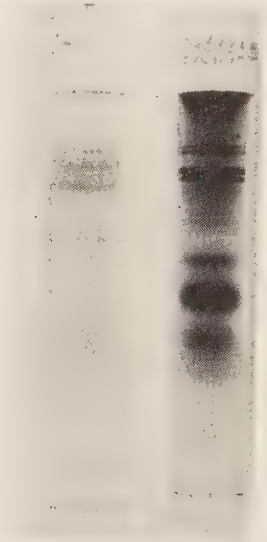

Abb.8. SDS-Gelelektrophorese von Polymerase C (rechts, Gipfelfraktion des Dichtegradienten) im Vergleich zu Polymerase B (links, Fraktion 19 von Hydroxylapatit) auf 5%-igen Polyacrylamid Gelen entsprechend der Methode von Weber und Osborn (29).

Um eine Zugehörigkeit einzelner Banden zur Enzymaktivität nachzuweisen, wurde eine weitere Elektrophorese mit allen Fraktionen des Gradienten durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, daß die meisten Banden in ihrem Auftreten dem Proteinprofil des Gradienten folgten, jedoch nach der Intensität ihres Auftretens keine Bande mit Sicherheit dem Verlauf des Aktivitätsprofils zugeordnet werden konnte.

Da das hier beschriebene Reinigungsverfahren der Polymerase C aus dem Zytoplasma von 200 Ratten nicht zur strukturellen

Klärung des Enzyms führte, werden zur genauen Darstellung der Untereinheiten dieser Polymerase weit größere Mengen an Ausgangsmaterial aufgearbeitet werden müssen.

Charakterisierung der RNA Polymerase C

Um die bei der Reinigung des Enzyms aufgetretenen chromatographischen Unterschiede zu den beiden Kernpolymerasen weiter zu erhärten, wurden durch funktionelle Untersuchungen die optimalen Synthesebedingungen der Polymerase C bestimmt.

Matritzenabhängigkeit

Bei der Bestimmung der Matritzenabhängigkeit mußte berücksichtigt werden, daß die Präferenz für native oder denaturierte DNA entscheidend von den Ionenbedingungen des Testansatzes bestimmt wird. Das Enzym wurde zunächst, entsprechend dem unter Methoden beschriebenen Standardansatz, auf seine Matritzenabhängigkeit untersucht, wobei sich eine Bevorzugung von denaturierter DNA gegenüber nativer DNA ergab (s.Tab.I Teil A).

Das Ergebnis jener Ansätze, in denen die DNA weggelassen oder durch Actinomycin D blockiert wurde (16), zeigte, daß das Enzym unbedingt DNA-abhängig ist. RNA oder synthetische Ribopolymere als Matritze wurden von dem Enzym nicht akzeptiert. Darüber hinaus wurden alle vier Ribonukleosidtriphosphate zur Synthese benötigt (Tab.I Teil B).

Einfluß von $Mg^{++}$, $Mn^{++}$ und Ionenstärke

Wie Abbildung 9 zeigt, bleibt die oben beschriebene Präferenz der Polymerase C für Einzelstrang DNA jedoch nicht bestehen, wenn das Enzym unter Bedingungen getestet wird, unter denen die Polymerase A maximale Aktivität zeigt, d.h. mit nativer DNA bei niedriger Ionenstärke in Gegenwart von $Mg^{++}$ als Kation.
In diesem Fall wird native DNA mit dem Faktor 1.7 besser transkribiert als denaturierte DNA. Während ein Zusatz von Salz in Gegenwart von Mangan die Aktivität in jedem Fall steigert, wird das Enzym durch Erhöhung der Ionenstärke bei

Tabelle I

| | Ansatz | Einbau von $[^3H]$UTP in % der Kontrolle |
|---|---|---|
| A. | Vollständiges System | 100.0 |
| | Vollständiges System -DNA | 6.0 |
| | Vollständiges System + Actinimycin D (20 ug/ml) | 11.0 |
| | Vollständiges System aber denat. DNA | 128.0 |
| | Vollständiges System -DNA + RNA (rRNA) | 2.0 |
| | Vollständiges System -DNA + poly A | 7.5 |
| | Vollständiges System -DNA + poly U | 0.0 |
| | Vollständiges System -DNA + poly G | 0.0 |
| | Vollständiges System -DNA + poly C | 0.0 |
| B. | Vollständiges System -GTP,-ATP | 3.0 |
| | " " -CTP,-ATP | 8.0 |
| | " " -GTP,-CTP | 12.0 |
| | " " -GTP,-ATP,-CTP | 11.8 |

Anwesenheit von Magnesium deutlich gehemmt - eine Erscheinung, die auch für Polymerase A beobachtet wurde.

Hemmung durch α-Amanitin

Als wichtigstes Differenzierungsmerkmal der beiden Kernpolymerasen A und B wurde ihr unterschiedliches Verhalten gegenüber dem spezifischen Inhibitor α-Amanitin erwähnt, der bei geringen Dosierungen von 0,01 ug/ml die Polymerase B weitgehend hemmt, während das A-Enzym auch bei hohen Konzentrationen dieses Wirkstoffes in seiner Aktivität nicht

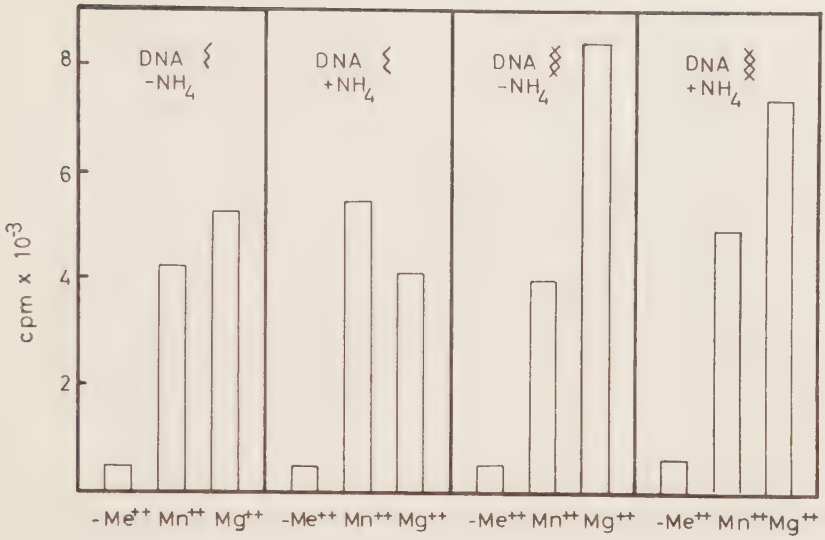


Abb.9. Effekt von $Mn^{++}$ (3.4 mM), $Mg^{++}$ (20 mM) und $(NH_4)_2SO_4$ (67 mM) auf die Aktivität der Polymerase C bei der Transkription nativer (⋛) und denaturierter (⟅) DNA. $-NH_4$ bedeutet ohne Salz; $-Me^{++}$ bedeutet ohne Kationen. Das Enzym der DEAE-Sephadex Säule wurde untersucht.

beeinflußt wird.
Es war daher interessant, die Wirkung dieses Inhibitors auf die zytoplasmatische RNA Polymerase zu untersuchen. Erste Versuche zeigten, daß eine Konzentration von 8.0 ug/ml α-Amanitin, bei welcher Polymerase B total inaktiv ist, das C-Enzym lediglich zu etwa 40% zu hemmen vermochte. Um genauere Einsicht in das Verhalten gegenüber α-Amanitin zu bekommen, wurde die Aktivität der Polymerase C über einen weiten Bereich steigender Inhibitorkonzentrationen verfolgt.

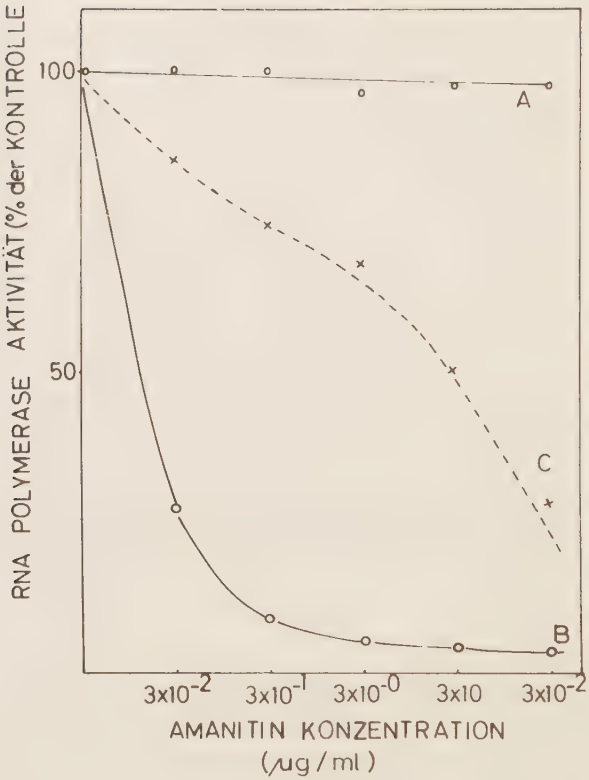


Abb.10. Effekt steigender Konzentrationen von α-Amanitin auf die Aktivität der RNA Polymerasen A, B und C. Die Amanitin Konzentrationen sind als Endkonzentrationen im Ansatz angegeben. Das Ergebnis für Polymerase C konnte für jede Präparationsstufe reproduziert werden.

Abbildung 10 zeigt deutlich, daß die Hemmung des C-Enzyms unter Bedingungen steigender Inhibitorkonzentrationen einen intermediären Verlauf zwischen der resistenten Polymerase A und der außerordentlich empfindlichen Polymerase B nimmt. Während eine halbmaximale Hemmung für B bei einer α-Amanitin Menge von 0.01 ug/ml eintrat, benötigte man um zwei bis

drei Größenordnungen höhere Konzentrationen, um die gleiche Inhibierung für Polymerase C zu erreichen.

Bindungsstudien mit $[^{14}C]$-γ-Methyl-Amanitin demonstrierten, daß die Notwendigkeit höherer Amanitin-Dosen zur Hemmung der Polymerase C nicht auf die Anwesenheit eines oder mehrerer unspezifischer Proteine in der Enzymlösung, die den Inhibitor ebenfalls binden könnten, zurückzuführen war.

Je 1 ml Enzymfraktion (Fraktion 25, Phosphozellulose Säule) wurde entweder mit einem Überschuß $[^{14}C]$-γ-Methyl-Amanitin (50 ug/ml im Ansatz) oder mit dem gleichen Volumen Polymerase-Puffer für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Abtrennung des freien Inhibitors von dem Protein-gebundenen $[^{14}C]$-Amanitin erfolgte durch Gelfiltration. Je 1.0 ml des Inkubats wurden auf zwei identische 1.0x30 cm G-75 Säulen aufgetragen und fraktioniert. Ein Aliquot von 250 ul jeder Fraktion wurde in 10.0 ml Brays Szintillationsflüssigkeit gezählt (34). Parallel dazu wurde die Polymeraseaktivität in den Inhibitor-behandelten und den Kontrollfraktionen gemessen und die Proteinkonzentration nach der Methode von Luck (30) bestimmt.

Abbildung 11 zeigt, daß bei einer etwa 40%-igen Hemmung des C-Enzyms noch ein großer Überschuß Amanitin vorhanden war, was eine Verschiebung der Titrationskurve zu höheren Werten durch unspezifische Inhibitorrezeptoren ausschloß.

Untersuchungen über die Aktivität der zytoplasmatischen RNA Polymerase nach Applikation von α-Amantin in vivo sollten das Verhalten der Polymerase C in der intakten Zelle gegenüber diesem Inhibitor klären und ein möglicherweise erst bei der Aufarbeitung der Gewebe eintretendes Ereignis ausschließen.

Jeweils 4 Ratten wurden 100 ug α-Amanitin pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach zwei Stunden wurden die Inhibitorgruppe und eine Kontrollgruppe (Puffer injiziert) getötet, entsprechend dem beschriebenen Verfahren die Polymerasen A, B und C isoliert und an DEAE-Zellulose

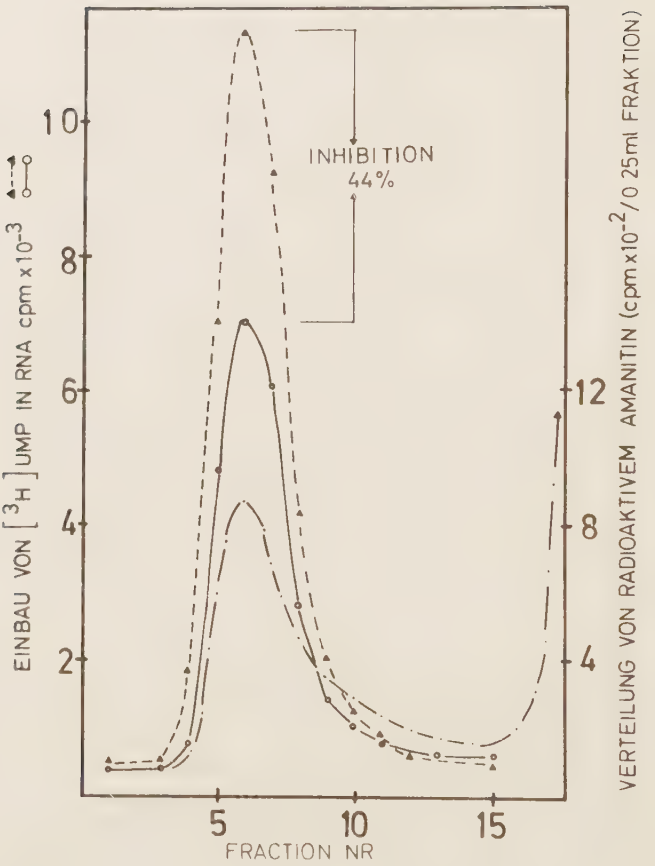


Abb.11. Bindung von [$^{14}$C]-γ-Methyl-Amanitin (•——) an eine RNA Polymerase C enthaltende Proteinfraktion. 1 uCi Amanitin waren in einer Endkonzentration von 50 ug/ml im Ansatz vorhanden. Anschließend an die Inkubation wurden die freie und die Protein-gebundene Radioaktivität durch Gelfiltration mit Sephadex G-75 getrennt. Parallel wurde die enzymatische Aktivität der Kontroll- (▲---▲) und Amanitin-behandelten Fraktionen gemessen (o——o).

chromatographiert. Die Präparation der Kernenzyme war für den Vergleich mit der zytoplasmatischen Aktivität notwendig und diente gleichzeitig als interne Kontrolle für die Aussagekraft dieses Experiments. Die Ergebnisse bestätigten das intermediäre Verhalten des C-Enzyms im Vergleich zu den beiden Kernenzymen.

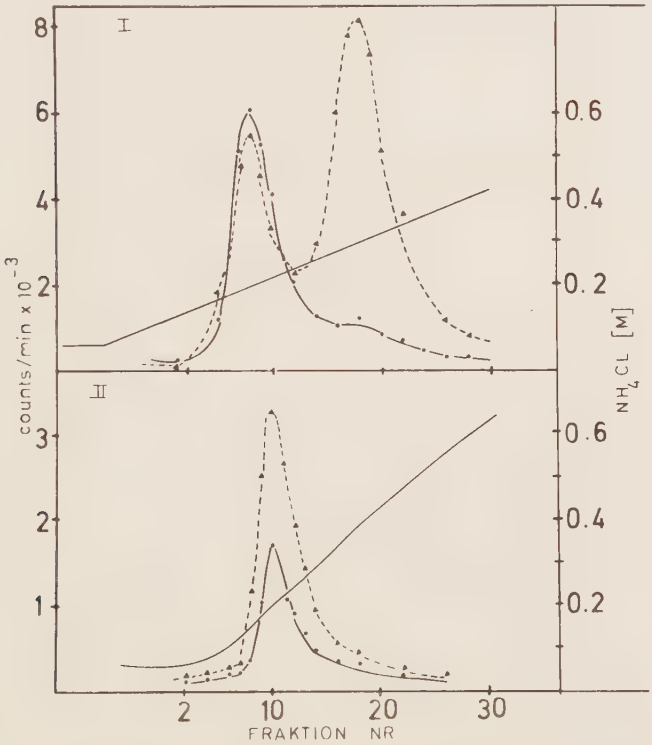


Abb.12. DEAE-Zellulose Chromatographie der Polymeraseaktivitäten des Zellkerns (I) und des Zytoplasmas (II) nach Applikation von α-Amanitin (100 ug/100 g Körpergewicht) in vivo. Die Elution der Säulen (2.5x6.5 cm) erfolgte mittels eines linearen Gradienten (80 + 80 ml; 0.0 auf 0.4 M Cl⁻) (▲---▲) Kontrolltiere; (•——•) Amanitin-behandelte Tiere.

Abbildung 12 zeigt, daß entsprechend dem in vitro-Verhalten die Polymerase C zu etwa 60% gehemmt war und damit gegenüber der Polymerase A (unbeeinflußt) und der Aktivität des B-Enzyms (kaum noch meßbar) eine Mittelstellung einnimmt.

Eine sehr ähnliche, zu den RNA Polymerasen des Zellkerns intermediäre Reaktion der zytoplasmatischen RNA Polymerase wurde kürzlich gegenüber Aflatoxin $B_1$ beobachtet (35), einem Hepatocarcinogen des Pilzes Aspergillus flavus mit einem stark hemmenden Effekt auf DNA- und RNA-Synthese (36).

Beeinflussung durch andere Inhibitoren

Tabelle II

| Ansatz | Einbau von $^3$H UTP in % der Kontrolle |
|---|---|
| Vollständiges System | 100 |
| Vollständiges System + Rifampicin (167 ug/ml) | 100 |
| Vollständiges System + Rifampicin AF/013 (400 ug/ml) | 5 |
| Vollständiges System + Stimulierender Faktor | 125 |
| Vollständiges System + Cycloheximid (400 ug/ml) | 100 |

Unter Standardbedingungen - wie bei Methoden beschrieben - getestet.

In Übereinstimmung mit den Kernpolymerasen ist das zytoplasmatische Enzym gegen Rifampicin und Cycloheximid in vitro resistent und wird durch halbsynthetische Rifampicinderivate bis zu 95 % gehemmt.

Verhalten gegen Stimulierenden Faktor

Ein von Seifart beschriebener, aus dem Zytoplasma von Rattenleberzellen isolierbarer Proteinfaktor (17), der die Transkriptionsrate der B-Polymerase erhöht, wurde hinsichtlich seiner Wirkung auf Polymerase C untersucht (s.Tab.II). Durch die Faktorfraktion wurde dem Polymerasestandardansatz 30 ug Protein hinzugefügt. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Faktorpräparation wurde in dem gleichen Experiment Enzym B untersucht, das in seiner Aktivität auf 270% gesteigert wurde. Tabelle II zeigt, daß Polymerase C weitgehend unbeeinflußt bleibt und hierin mit den für Polymerase A beschriebenen Befunden (17) übereinstimmt.

Verhalten gegen Antikörper

Um mögliche strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der zytoplasmatischen Polymerase C und den RNA Polymerasen des Zellkerns nachzuweisen, wurden Versuche mit Antikörpern durchgeführt, die von der Arbeitsgruppe von P.Chambon in Straßburg hergestellt worden waren. Chambon und Mitarbeitern gelang es, Antikörper gegen Kalbsthymus RNA Polymerase A zu isolieren. Die Spezifität dieser Antikörper wurde in Polymerasetests untersucht und zeigte, daß lediglich Kalbsthymus Polymerase A - zu etwa 90% - , das entsprechende B-Enzym aber kaum gehemmt wurde. Dieser Befund konnte durch einen Ouchterlony-Test bestätigt werden (37).

Da für eine Aussage über strukturelle Ähnlichkeiten ein direkter Vergleich aller RNA Polymerasen notwendig war, wurden alle drei Leberenzyme A, B und C parallel mit Thymus-Anti A unter Standardbedingungen getestet. Um sicherzustellen, daß ein möglicherweise zu beobachtender Effekt nicht einfach auf eine unspezifische Wirkung von den in der Antikörperlösung enthaltenen Plasmaproteinen zurückzuführen ist, wurden die Kontrollen parallel mit einer Gesamt-$\gamma$-Globulin Fraktion getestet.

Das Ergebnis der Tabelle III zeigte, daß die gegen Kalbsthymus Polymerase A gewonnenen Antikörper auch das entsprechende Rattenleberenzym, wenn auch zu einem geringeren Prozentsatz,

Tabelle III

| Enzym | Kontrolle cpm, $^{+}$) | $\gamma$-Globulin cpm, $^{++}$) | % Veränd. gegen Kontrolle | Anti A cpm, $^{++}$) | % Veränd. gegen $\gamma$-Glob. |
|---|---|---|---|---|---|
| A | 11745 | 11901 | + 2% | 6531 | -46% |
| B | 4251 | 5213 | +19% | 5073 | - 3% |
| C | 7756 | 8960 | +14% | 5854 | -35% |

$^{+}$) 10 ul Tris; $^{++}$) 10 ul Proteinfraktion; cpm stellen Mittelwerte aus mindestens zwei Versuchen mit Duplikaten dar.

zu hemmen vermochten. Darüber hinaus wurde die zytoplasmatische Rattenleber RNA Polymerase ebenfalls deutlich von diesen Antikörpern inhibiert, was eine strukturelle Ähnlichkeit beider Enzyme, zumindest in dem die Antigen-Funktion tragenden Teil des Moleküls, nahezulegen scheint. Rattenleber Polymerase B wurde in seiner Aktivität nicht gehemmt; dies stimmt mit der zu beobachtenden unwesentlichen Hemmung der Kalbsthymus Polymerase B von ca. 5% durch diese Antikörper überein.

Zusammengenommen besitzt die zytoplasmatische RNA Polymerase C grundsätzlich die katalytischen Eigenschaften der klassischen RNA Polymerasen A und B des Zellkerns, läßt sich jedoch von diesen Enzymen aufgrund ihrer chromatographischen und funktionellen Eigenschaften deutlich differenzieren.

Damit stellte sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser im Zellplasma auftretenden RNA Polymerase.

Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der RNA Polymerase C

Die Experimente, mit denen bezweckt wurde, die biologische Rolle dieses Enzyms zu klären, basierten auf der Annahme, daß die zytoplasmatische Aktivität möglicherweise ein Depot neu synthetisierter Enzymmoleküle darstellt, die nach Bedarf in Polymerase A oder B umgewandelt werden können. Daher war das Ziel dieser Versuche, folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist eine Änderung der RNA Syntheserate auch durch einen Wechsel der Aktivität oder Menge der RNA Polymerase in der Zelle zu erklären?
   Und damit zusammenhängend - wie lang ist die biologische Halbwertzeit dieser Moleküle ?
2. Kann unter Berücksichtigung dieser Halbwertzeiten eine Synthesebeziehung zwischen den Kernpolymerasen A und B und der zytoplasmatischen Polymerase C nachgewiesen werden ?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden Experimente in vivo durchgeführt, unter Bedingungen, die bekanntermaßen die RNA Syntheserate verändern. Anschließend wurden die multiplen RNA Polymerasen extrahiert und an DEAE-Zellulose chromatographiert. Diese Enzyme wurden in ihrer Aktivität mit den nach der gleichen Methode aus Kontrolltieren erhaltenen Enzymen verglichen.

Eine Veränderung der RNA Syntheserate wurde durch Hemmung mit Cycloheximid einerseits oder durch Stimulierung durch Teilhepatektomie oder durch Hormongabe andererseits erreicht.

Einfluß von Cycloheximid

Cycloheximid (Actidion) ist als wirksamer Inhibitor der Proteinbiosynthese bekannt und bewirkt gleichzeitig, wahrscheinlich indirekt, eine starke Hemmung der RNA Synthese (38-46). Durch Blockierung der Proteinbiosynthese sollte die Neusynthese von RNA Polymerase-Molekülen unterbunden werden und aus einer möglicherweise auftretenden Abnahme der einzelnen Enzymaktivitäten die biologische Halbwertzeit der

Polymerasen bestimmt werden.

Gruppen von je drei Ratten (120-140 g) wurden entweder Puffer (Kontrollen) oder Cycloheximid in einer Konzentration von 400 ug/100 g Körpergewicht injiziert. Nach Zeiträumen von 5 Minuten bis 24 Stunden wurden je eine Kontroll- und Inhibitor- Gruppe getötet. Ein Tier jeder Gruppe erhielt 30 Minuten zuvor L-$[^{14}C]$-Tyrosin (22 uCi/100 g Körpergewicht) injiziert, um später das Ausmaß der Proteinsynthese im Verlauf des Experiments verfolgen zu können (s.Tab.IV). Die RNA Polymeraseaktivitäten wurden, wie unter Methoden beschrieben, extrahiert und an DEAE-Zellulose chromatographiert. Alle Schritte zur Gewinnung der Enzyme von den behandelten und den zugehörigen Kontrolltieren wurden simultan unter identischen Bedingungen durchgeführt, um einen direkten Vergleich beider Gruppen zu ermöglichen.

Abbildung 13 zeigt als Ergebnis, daß nach Cycloheximid-Applikation über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden keine wesentliche Änderung der zytoplasmatischen Polymeraseaktivität beobachtet werden kann. Die Kurven repräsentieren jeweils die absoluten Aktivitäten. Eine Korrektur der Werte nach der Proteinkonzentration in den Fraktionen wurde nicht vorgenommen, da der Proteingehalt als Konsequenz der Cycloheximid Behandlung (Hemmstoff der Proteinsynthese) schwanken könnte und so ein Effekt, den der Versuch aufzeigen sollte, möglicherweise nachträglich beseitigt worden wäre. Es wurde jedoch größte Sorgfalt darauf gelegt, die experimentellen Bedingungen gleich zu halten. Eine Korrektur der Kurven nach DNA Konzentrationen, die aus Proben verschiedener Präparationsstufen dieses Experimentes ermittelt wurden, ergab keine Veränderung der Profile.

Wie Abbildung 14 zeigt, unterlagen die Aktivitäten der Kernpolymerasen A und B unter diesen Bedingungen ebenfalls keinen signifikanten Veränderungen im Laufe des untersuchten Zeitraums,dies galt ebenso für das Verhältnis von A zu B. Kleine Schwankungen, die zwischen den Behandlungsgruppen auftraten, folgten nicht dem Verlauf der Proteinbiosynthese-Hemmung, sodaß sie experimentellen Abweichungen beziehungs-

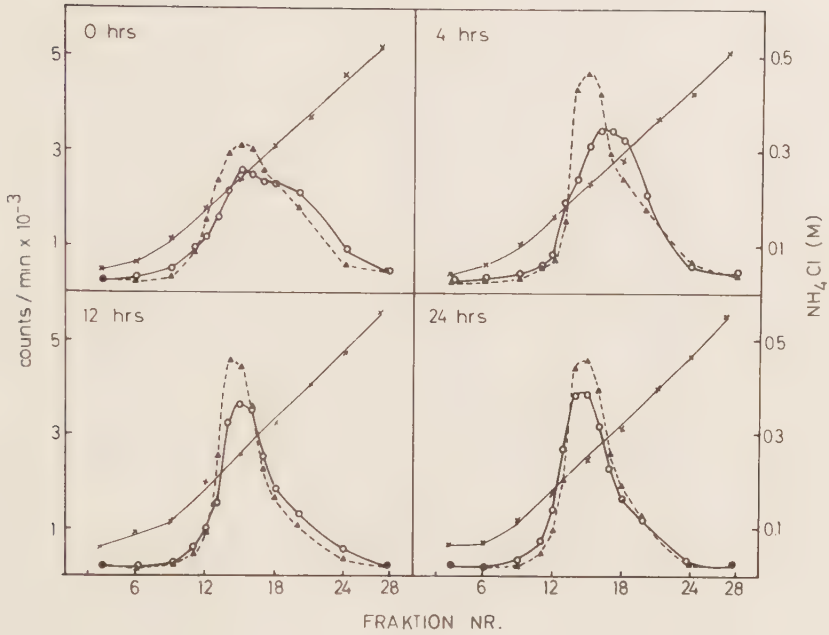


Abb.13. DEAE-Zellulose Vergleichschromatographie des Zytoplasmas der Kontrollen (▲---▲) und der Cycloheximid-behandelten Tiere (o---o) an identischen 2.5x6.5 cm Säulen. Die Kontrolle und die zugehörige Behandlungsgruppe wurden jeweils parallel chromatographiert. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten (80 + 80 ml; 0.0 auf 0.6 M $NH_4Cl$). Fraktionen von 3.5 ml wurden bei einer Flußrate von 40 ml/Std. gesammelt.

weise individuellen Schwankungen zugerechnet werden müssen.

Tabelle IV zeigt 4 Stunden nach Injektion von Cycloheximid eine drastische Hemmung der gesamten Proteinsyntheserate von 86%. Diese Hemmung bestand nach 12 Stunden immer noch zu 76%. Nach 24 Stunden war eine Steigerung der Proteinbiosynthese auf 66% des Ausgangswertes wieder eingetreten,

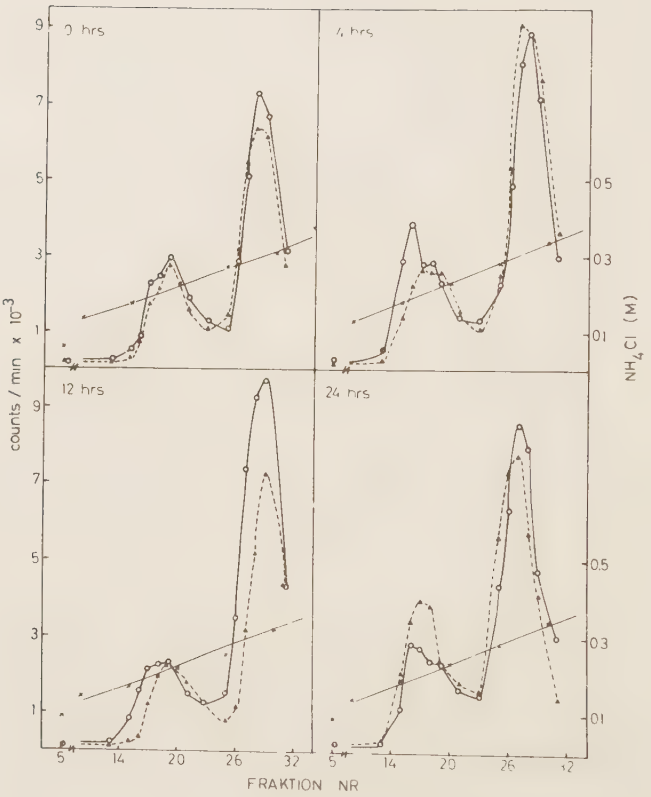


Abb.14. DEAE-Zellulose Vergleichschromatographie der RNA Polymeraseaktivitäten der Zellkerne von Kontrollen (▲---▲) und Cycloheximid-behandelten Tieren (o---o) unter den in Abb. 13 beschriebenen Bedingungen. In diesem Fall stieg der Gradient von 0.0 auf 0.4 M $NH_4Cl$ an.

was auch am Allgemeinzustand der Tiere erkennbar war. Eine vollständige Hemmung der Proteinsynthese im Laufe des Experiments war nicht beabsichtigt, da Vorversuche mit

Tabelle IV

| Gruppe | $K_O$ | $C_O$ | $K_4$ | $C_4$ | $K_{12}$ | $C_{12}$ | $K_{24}$ | $C_{24}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cycloheximid | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Zeit (Std.) | 0 | 0 | 4 | 4 | 12 | 12 | 24 | 24 |
| Protein (cpm/mg) | 2105 | 2097 | 3338 | 437 | 2884 | 691 | 3365 | 2230 |
| Inhibierung (%) | | 0.5 | | 86.9 | | 76.0 | | 33.7 |

O Stunden bedeutet, daß die Tiere nach 5 Minuten getötet wurden, wodurch lediglich die Resorption des Inhibitors abgewartet wurde.
Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry durchgeführt.
Zur Bestimmung der in vivo Proteinsyntheserate wurdem einem Tier jeder Gruppe 22 uCi/100 g Gewicht L-[$^{14}$C]-Tyrosin injiziert, 30 Minuten bevor die Tiere getötet wurden. Ein Aliquot des ultrazentrifugierten Zytoplasmas wurde mit einem gleichen Volumen 2.2 M TCA gefällt. Das Sediment wurde 3 mal mit 12% TCA gewaschen, 2 mal mit Methanol nachgewaschen und nach dem Lösen in Ameisensäure wurde je 1 ml davon in 15 ml Brays-Szintillator gezählt.

höheren Inhibitorkonzentrationen (8 mg/100 g Gewicht) gezeigt hatten, daß die Tiere unter diesen Bedingungen 6 Stunden nicht über-lebten.

Versuche, die in diesem Konzentrationsbereich über eine Wirkzeit von 4 Stunden durchgeführt wurden, zeigten eine totale Hemmung der Proteinbiosynthese. Unter diesen Bedingungen wurden Polymerase C und B ebenfalls nicht beeinflußt, während die Aktivität der Polymerase A um etwa 12% verringert war. Es ist offensichtlich, daß RNA Polymerasen nach einer bestimmten Lebensdauer abgebaut werden, nur scheinen diese Moleküle längere Halbwertzeiten zu besitzen und damit eine ziemlich beständige Population darzustellen.

Diese Ergebnisse stehen in direktem Widerspruch zu Resultaten, die von Yu und Feigelson veröffentlicht wurden (47), die die nukleolare RNA Polymerase A als kurzlebig mit einer Halbwertzeit von 1.3 Stunden beschrieben. Bei jenen Experimenten wurden jedoch, im Gegensatz zu den hier aufgeführten Versuchen, keine isolierten Enzyme studiert, sondern die nukleolare und extranukleolare RNA Synthese intakter Zellkerne nach Gabe von Cycloheximid gemessen.

Einfluß von Cortisol

Neben der Wirkung anderer Hormone ist vor allem für Cortisol eine Stimulierung der RNA Synthese in vivo seit langem beschrieben (48-59). Darüber hinaus zeigen die von Cortisol-behandelten Tieren gewonnenen intakten Zellkerne auch in vitro einen höheren Einbau markierter Ribonukleotide, im Vergleich zu den Kontrollen. Neben einer Steigerung der Matritzen-Verfügbarkeit und einer Hemmung der RNase Aktivität (60), beschreiben mehrere Autoren als Wirkung des Hormons ein starkes Ansteigen vor allem der nukleolaren RNA Polymeraseaktivität (58,61,62).

Das folgende Experiment wurde mit der Annahme durchgeführt, daß als Folge der Hormonbehandlung tatsächlich eine Steigerung der nukleolaren RNA Polymerase selbst eintritt, und dabei möglicherweise eine Relation der drei Enzyme untereinander erkennbar wird.

Gruppen von je drei Tieren wurde 3 Stunden bevor sie getötet wurden entweder Cortisol (in 0.9% NaCl) in einer Konzentration

von 3 mg/100 g Körpergewicht oder ein gleiches Volumen physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Um eine möglicherweise auftretende Stimulierung besonders deutlich zu machen, wurde die Höhe des endogenen Hormonspiegels gesenkt, indem den Tieren 3 Tage vor dem Experiment die Nebennieren entfernt wurden. Die Polymerasen wurden wie beschrieben extrahiert und an DEAE-Zellulose chromatographiert.

Abbildung 15 zeigt für die zytoplasmatische Polymerase C (unterer Teil) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Das gleiche Resultat ergab sich für die Kernpolymerasen A und B unter diesen Bedingungen (oberer Teil). Lediglich eine unwesentlich geringere Aktivität der Kontrollfraktionen, die einer geringeren Proteinkonzentration in diesen Fraktionen entsprach, war zu erkennen.

Eine physiologische Beziehung zwischen den Polymerasen des Zytoplasmas und des Zellkerns ließ sich unter diesen Bedingungen nicht nachweisen. Darüber hinaus steht dieses oftmals reproduzierte Ergebnis in Widerspruch zu den beschriebenen Cortisol-Stimulierungen der nukleolaren RNA Polymerase bis zu 270% (58,61,62).

Zusammen-genommen sprechen diese nach Cycloheximid und Hormonbehandlung zu beobachtenden Ergebnisse den RNA synthetisierenden Enzymen eine bemerkenswerte Stabilität mit einer Halbwertzeit von mehr als 12 Stunden zu. Es kann daher nicht angenommen werden, daß zumindest die kurzfristige Veränderung der RNA Syntheserate durch die Größe "Enzymkonzentration in der Zelle" kontrolliert werden könnte. Diese Folgerung würde mit Ergebnissen von Chambon übereinstimmen (63), der einen großen Überschuß von RNA Polymerasemolekülen gegenüber spezifischen Initiationsstellen der RNA Synthese in der Zelle fand. Daher erscheint es möglich, daß die Regulation der RNA Synthese in der Eukaryotenzelle durch andere Faktoren erreicht wird. Es wäre denkbar, daß kurzlebige und induzierbare Proteinfaktoren, wie sie von Muramatsu postuliert wurden (44) und die auf kurzlebigen messenger-RNA Molekülen synthetisiert sein könnten, als

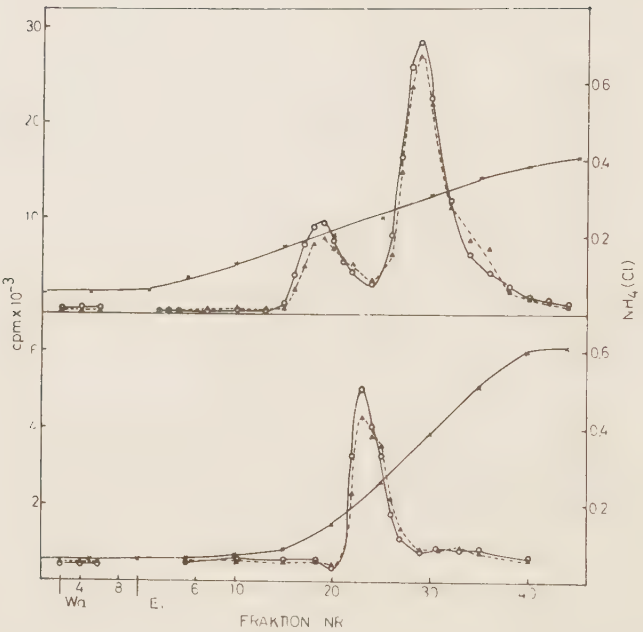


Abb.15. DEAE-Zellulose Vergleichschromatographie der RNA Polymeraseaktivität der Zellkerne (oberer Teil) und des Zytoplasmas (unterer Teil) von adrenalektomierten Ratten, die mit Salz (Kontrolle ▲---▲) oder mit Cortisol (o---o) behandelt wurden. Die Bedingungen stimmten mit den in Abb. 13 und 14 beschriebenen überein.

spezifische Regulatoren zur schnellen Adaptation der RNA Synthese an geänderte physiologische Verhältnisse fungieren.

Unter Berücksichtigung dieser Punkte reichten möglicherweise die mit den beschriebenen Experimenten erzielten Veränderungen der RNA Syntheserate nicht aus, um in dem Transkriptionssystem des Zellkerns einen RNA Polymerasemangel hervorzurufen. Da es fraglich war, ob dieses mit stationären Zellen über-

haupt erreichbar war, wurde regenerierende Rattenleber auf einen Zusammenhang der RNA Polymeraseaktivitäten untereinander untersucht.

Einfluß von Teilhepatektomie

15 Stunden nach partieller Hepatektomie von Rattenlebern beobachtet man eine sehr große Stimulierung der DNA Synthese in den Zellen des Restgewebes. Die dieser DNA Synthese vorausgehende Phase ist durch gesteigerte Stoffwechselaktivität charakterisiert, die sich unter anderem in einer Zunahme der Protein- und RNA-Synthese zeigt (64-70). Für die Zunahme der RNA Synthese nach Teilhepatektomie werden drei Mechanismen beschrieben:

1. Zunahme der Matritzenaktivität (68).
2. Veränderungen der Substratmenge (Ribonukleotide) für die RNA Synthese (70).
3. Zunahme der RNA Polymerase (64-66).

Zu 3. muß bemerkt werden, daß diese gesteigerte Aktivität der RNA Polymerase als Inkorporation von markierten Ribonukleotiden durch intakte Zellkerne bestimmt wurde, was nicht unbedingt eine Steigerung der RNA Polymerasemenge bzw. Aktivität selbst beweist.

Unter der Annahme, daß eine Synthesebeziehung zwischen den Kernpolymerasen und dem zytoplasmatischen Enzym besteht, sollte, als Folge des Eingriffs, ein vermehrter Bedarf an Polymerase A und B zunächst durch eine Umwandlung des zytoplasmatischen "precursor-pools" gedeckt werden. Diese Umwandlung sollte sich experimentell durch eine Abnahme der Polymerase C nachweisen lassen.

Zur Durchführung wurden acht Ratten, entsprechend der Methode von Higgins und Anderson (71), der mittlere und der linke Leberlappen (ca.67% der Gesamtleber) operativ entfernt. Um die Veränderung der in vivo-RNA Syntheserate bestimmen zu können, bekamen die Tiere 20 Minuten bevor sie getötet wurden 20 uCi $^{3}H$ -Orotsäure (Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Pyrimidinnukleotide) pro 100 g Körpergewicht

injiziert. 12 Stunden nach der Operation wurden die Tiere getötet und die Restlebern, nach dem Spülen mit TSS-Puffer, entnommen.
Zur Berechnung der Inkorporationswerte von $[^3H]$-Orotsäure wurden vom Leberhomogenat jeder Gruppe Aliquots (jeweils 50 ul und 150 ul) entnommen, auf Filterplättchen pipettiert und in 5%-iger Trichloressigsäure praezipitiert. Die Plättchen wurden, entsprechend dem unter Methoden (Aktivitätstest) beschriebenen Verfahren, ausgewaschen und gezählt.

Von den operierten Tieren und einer Kontrollgruppe wurden, wie beschrieben, die drei RNA Polymerasen unter identischen Bedingungen extrahiert und parallel an DEAE-Zellulose chromatographiert.

Das Ergebnis wird in Abbildung 16 durch Kurven dargestellt, die nach dem DNA Gehalt der Zellkernextrakte beider Gruppen normiert wurden. Einem deutlichen Anstieg der RNA Polymeraseaktivitäten des Zellkerns steht eine leichte Reduktion der zytoplasmatischen RNA Polymerase gegenüber. Ein Vergleich der Flächen unter den jeweiligen Aktivitätsgipfeln ergab folgende Veränderungen der operierten Ratten gegenüber den Kontrolltieren.

Tabelle V

| Enzym | Kontrolle % Fläche | Teilhepatektomie % Fläche |
|---|---|---|
| A | 100 | 198 |
| B | 100 | 131 |
| C | 100 | 84 |

Im Vergleich dazu ergab sich aus den Einbauraten von $[^3H]$-Orotsäure bei den operierten Tieren eine Steigerung der gesamten RNA Synthese um den Faktor 3,6 .
Diese Veränderungen der RNA Polymeraseaktivitäten nach Teilhepatektomie, die auf einen Zusammenhang zwischen den

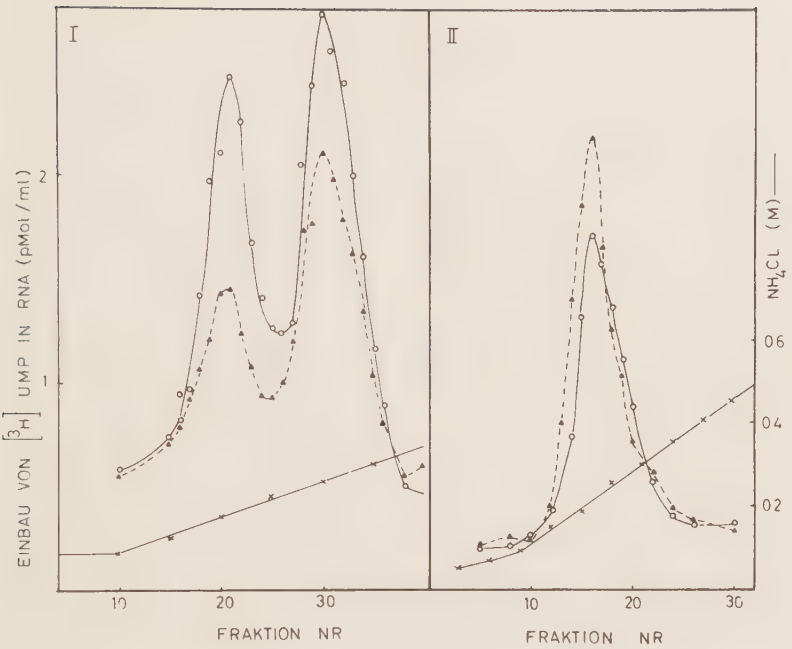


Abb.16. DEAE-Zellulose Chromatographie der Polymeraseaktivitäten der Zellkerne (Teil I) und des Zytoplasmas (Teil II) von Kontrolltieren (▲---▲) und partiell hepatektomierten Ratten (o---o). Die Bedingungen entsprachen denen der Abbildungen 13 bis 15.

Enzymen des Zellkerns und des Zytoplasmas hindeuten, konnten in mehreren Experimenten reproduziert werden.

Obwohl aus diesen Ergebnissen allein kein Beweis für eine Synthesebeziehung zwischen den drei Rattenleber RNA Polymerasen abgeleitet werden kann, stellen diese Befunde, unter Berücksichtigung der außerordentlichen Stabilität dieser Enzyme, einen ersten Hinweis für einen Zusammenhang zwischen den Polymerasen des Zytoplasmas und des Zellkerns dar.

## Diskussion

Da das genetische Material einer Eukaryotenzelle - abgesehen von den Mitochondrien - im Zellkern lokalisiert ist (Befunde über geringe Mengen zytoplasmatischer DNA (72) konnten noch nicht eindeutig bestätigt werden), stellt das Auffinden einer zytoplasmatischen RNA Polymeraseaktivität, die absolut DNA-abhängig ist, ein erstaunliches Phänomen dar, zumal dieses Enzym im Zellkern nicht zu finden ist und eine Herkunft von dort ausgeschlossen werden kann (s.unten: Amanitin - in vivo; Inkubation von A und B mit Supernatant).

Ein direkter quantitativer Vergleich der einzelnen Polymeraseaktivitäten der Zelle, der aus einem Homogenat des gesamten Gewebes durchgeführt werden müßte, ist auf Grund von Kontamination mit RNase, verschieden starker Fixierung der Enzyme an Zellorganellen und unterschiedlicher Schwierigkeiten, die Polymerasen mit zugesetzter Matritze zu erreichen, in einem Rohextrakt sehr fragwürdig. Vorsichtige Berechnungen, die trotz dieser Fehlermöglichkeiten durchgeführt wurden, ergaben, daß etwa 30% der gesamten RNA Polymeraseaktivität der Rattenleberzelle im partikelfreien Zellsaft zu finden ist.

Um auszuschließen, daß dieses im Zellplasma beobachtete Enzym mit einer der klassischen RNA Polymerasen identische ist und lediglich beim Homogenisieren der Zellen in das Zytoplasma austritt, ist es notwendig, das Enzym von den beiden Polymerasen des Zellkerns und der mitochondrialen RNA Polymerase eindeutig zu differenzieren.

Zur Abgrenzung gegenüber den Kernpolymerasen A und B läßt sich zunächst das chromatographische Verhalten der Polymerase C heranziehen. Während die Enzyme A und C an DEAE-Zellulose nicht zu differenzieren sind, wird Enzym B in einem Bereich eluiert, in dem der Extrakt des Zellplasmas überhaupt keine Aktivität mehr aufweist. An Phosphozellulose hingegen liegen die Elutionspunkte für C und B dicht zusammen, während Enzym A erst bei deutlich höherer Ionenstärke eluiert wird und von C klar abgegrenzt werden kann.

An Hydroxylapatit wiederum lassen sich Polymerase B und C gut trennen.

Diese chromatographischen Unterschiede werden durch funktionelle Unterschiede ergänzt, wobei das Verhalten der Enzyme gegenüber α-Amanitin von entscheidender Bedeutung ist. Die Mittelstellung zwischen der resistenten A-Polymerase und dem außerordentlich empfindlichen B-Enzym konnte für Polymerase C auf allen Präparationsstufen dargelegt werden, sodaß eine Kontamination mit einem unspezifischen, Inhibitor-bindenden Protein als Ursache für dieses andersartige Verhalten gegenüber α-Amanitin unwahrscheinlich ist, was auch durch die $[^{14}C]$-γ-Methyl-Amanitin Bindungsversuche bestätigt wird. Während die Hemmung durch α-Amanitin, trotz der großen Unterschiede der $K_i$-Werte, Polymerase C dem B-Enzym ähnlich erscheinen läßt, lassen die Reaktionen auf Antikörper (Anti A) und den stimulierenden Faktor mehr auf eine strukturelle Verwandtschaft des Enzyms zu Polymerase A schließen. Auch die optimalen Synthesebedingungen mit nativer DNA in Gegenwart von Magnesium bei niedriger Ionenstärke sprechen für eine Beziehung zur nukleolaren A-Polymerase, während Polymerase C die Bevorzugung von Mangan und höherer Salzkonzentration bei der Transkription denaturierter DNA mit dem B-Enzym teilt.

Zusammengenommen kann man feststellen, daß Polymerase C sowohl in ihrem chromatographischen als auch in ihrem funktionellen Verhalten zum Teil Übereinstimmungen mit den beiden Kernenzymen aufweist, daß aber andere Punkte eine Identität des Enzyms mit einer der Kernpolymerasen eindeutig ausschließen.

Zur Abgrenzung der mitochondrialen Polymerase lassen sich folgende Punkte anführen. Das mitochondriale Enzym weist ein Molekulargewicht von etwa 65.000 Dalton auf (25,26), während Bestimmungen mittels Dichtegradientenzentrifugation für Polymerase C ein Molekulargewicht von etwa 500.000 Dalton ergaben. Nun ist bekannt, daß das mitochondriale Enzym als Oligomeres (zu 8 Einheiten) auftritt und erst bei höherer Salzkonzentration in die Monomere zerlegt wird. Um

nachzuweisen, daß Polymerase C nicht ebenfalls ein Oligomeres darstellt, wurde eine Gelfiltration mit Sephadex G-200 in Gegenwart von 0.3 M $NH_4Cl$ durchgeführt, deren Ergebnis vollkommen mit dem in Abbildung 6 gezeigten Resultat übereinstimmte und unter diesen Bedingungen nicht die geringste Verschiebung der Aktivität zu niedrigeren Molekulargewichtsbereichen aufwies. Ein weiterer Punkt zur Differenzierung beider Enzyme liegt in der Rifampicin-Resistenz der Polymerase C. Darüber hinaus ist bisher für keine mitochondriale Polymerase eine eindeutige Hemmung durch α-Amanitin beschrieben worden. Morphologische Gesichtspunkte, wie ihre feste strukturelle Bindung, schließen zusätzlich eine Identität der mitochondrialen Polymerase mit der aus dem postmitochondrialen Überstand isolierbaren Aktivität aus. Auch muß die relativ große Menge zytoplasmatischen Enzyms berücksichtigt werden; im Gegensatz dazu stehen die sehr geringen Aktivitätsmengen, die sich aus gereinigten Mitochondrien isolieren lassen.

Nachdem eine Identität der Polymerase C mit einer der drei oben beschriebenen RNA Polymerasen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte, blieb aber noch die Möglichkeit bestehen, daß zumindest eine, bei der Präparation in das Zytoplasma ausgetretene Kernpolymerase dort durch ein nicht bekanntes System enzymatisch modifiziert wurde und danach als von A und B verschiedene Aktivität in Erscheinung trat. Diese Möglichkeit einer Transformation der Kernenzyme im Zellplasma wird, zumindest für Polymerase B, durch das Ergebnis der in vivo Versuche mit α-Amanitin ausgeschlossen (s.Abb.12). Obwohl die gesamte B-Polymerase bereits vor dem Homogenisieren des Gewebes, also noch in der intakten Zelle, durch Bindung des Inhibitors gehemmt wird, tritt die intermediär reagierende Polymerase C unverändert auf. Eine mögliche Transformation von Polymerase A zu C, die unter diesen Bedingungen nicht erfaßt würde, müßte eine völlig neue Eigenschaft, nämlich die Amanitin-Hemmbarkeit, in das Molekül einführen. Obwohl diese Möglichkeit nicht sehr wahrscheinlich schien, wurden Versuche durchgeführt, in denen

gereinigte Kernenzyme jeweils 4 Stunden bei 0 °C (das entspricht den Bedingungen während der Präparation) mit partikelfreiem Supernatant inkubiert wurden. Anschließend wurde, als wichtigstes Charakterisierungsmerkmal, das Verhalten gegenüber α-Amanitin untersucht. Eine Transformation von A zu C sollte eine Verminderung der Amanitin-resistenten Aktivität, eine Umwandlung von B in C sollte eine Abnahme der Amanitin-hemmbaren Aktivität bewirken. Im Ergebnis war jedoch in beiden Fällen keine Änderung der Reaktion auf Amanitin, im Vergleich zu Kontrollinkubaten, zu beobachten.

Eine weitere mögliche Identität der Polymerase C mit anderen RNA synthetisierenden Polymeraseaktivitäten der Zelle wurde durch die ermittelten Synthesebedingungen ausgeschlossen. Unter Bedingungen der Polynukleotidphosphorylase, ohne DNA, dafür mit poly U als Matritze und UDP, in Gegenwart von Magnesium, als Substrat (73), zeigte Polymerase C keine Aktivität.
Die Bildung von Homoribonukleotiden durch Terminalnukleotidtransferasen, die für einige biologische Systeme beschrieben wurde (74-78) und die ATP Polymerase (E.C.2.7.7.19.) sind jeweils DNA-unabhängig und daher mit Actinomycin D nicht hemmbar. Im Falle der Polymerase C hingegen kann native oder denaturierte DNA nicht durch RNA oder synthetische Ribopolymere ersetzt werden.

Da diese Punkte zusammengenommen die Identität des C-Enzyms mit einer der klassischen Polymerasen oder einer anderen Polyribonukleotide synthetisierenden Enzymaktivität widerlegen und darüber hinaus eine artefizielle Herkunft des Enzyms unwahrscheinlich ist, muß die Polymerase C als eigenständiges Enzym betrachtet werden, für dessen physiologische Bedeutung sich vorerst zwei Hypothesen anbieten.

1. Es ist nachgewiesen, daß alle bisher daraufhin untersuchten Kernproteine im Zytoplasma synthetisiert werden. Daher wäre es gut möglich, daß die im Zellplasma gefundene Polymeraseaktivität eine Population neu synthetisierter RNA Polymerasemoleküle darstellt, die bei Bedarf in ihre funktionelle Form,

d.h. Polymerase A oder B transferiert werden.

2. Polymerase C besitzt im Zytoplasma eine echte funktionelle Aufgabe. Diese Möglichkeit gewinnt im Zusammenhang mit der seit längerem beschriebenen "informational DNA" des Zytoplasmas (72,79) Bedeutung, eine DNA, die auch außerhalb des Zellkerns transkribiert werden soll.

Gegen die zweite Annahme würde die große Menge an Polymerase C im Zytoplasma sprechen, denn i-DNA ist bisher nur in Mikrogramm-Mengen unter großen Schwierigkeiten im Zellsaft nachgewiesen worden (80),und ihre funktionelle Existenz konnte nicht von allen Forschergruppen bestätigt werden.

Auf der Grundlage der ersten Hypothese wurden Experimente durchgeführt, bei denen durch Veränderung der RNA Syntheserate und der Polymerasemenge nach einem funktionellen Zusammenhang aller drei Enzyme gesucht werden sollte. Eine veränderliche RNA Syntheserate beobachtet man nach Cycloheximid, Cortisol und partieller Hepatektomie. In Anbetracht der beschriebenen Ergebnisse scheint die Regulation der RNA Synthese, unter dem Einfluß von Cycloheximid und Cortisol, nicht über die Menge des beteiligten Enzyms zu erfolgen (81). Unsere Daten stützen vielmehr die bereits früher von Muramatsu (20) und Baulieu (82) aufgestellte Hypothese, daß unter diesen Bedingungen eine Veränderung der RNA Syntheserate entweder über die Regulation der Matritzenaktivität des Chromatins oder durch zusätzliche an dem Transkriptionsschritt beteiligte Komponenten (z.B. Proteinfaktoren) erreicht wird, die gegebenenfalls sehr schnell zur Verfügung stehen und einer kurzen Halbwertzeit unterliegen.

Zur Darstellung eines funktionellen Zusammenhanges der drei RNA Polymerasen A, B und C wurde jedoch ein System benötigt, in dem wirklich eine Änderung der Enzymmenge oder Aktivität erreichbar ist. Diese Voraussetzung erfüllt regenerierende Rattenleber. In diesem System wurde eine Stimulierung der RNA Polymeraseaktivität des Zellkerns bei gleichzeitiger Reduktion der zytoplasmatischen Aktivität gefunden. Diese

Ergebnisse stellen einen deutlichen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen den Polymerasen des Zellkerns und des Zytoplasmas dar. Damit ist mit der regenerierenden Rattenleber ein wichtiger Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen gefunden.
Darüber hinaus wird versucht werden müssen, durch Darstellung der Untereinheiten des Enzyms mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese, den Nachweis einer strukturellen Verwandtschaft der Polymerase C mit den Kernenzymen zu erbringen.
Der direkte Beweis, sowohl für eine strukturelle Verwandtschaft als auch für die genaue zelluläre Lokalisation aller drei RNA Polymerasen wird nur mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen alle drei Enzyme möglich sein.
Diese weiteren Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die biologische Rolle der zytoplasmatischen RNA Polymerase zu klären.

Der zunächst überraschende Befund, daß im Zytosol eine DNA-abhängige RNA Polymerase vorkommt, wurde inzwischen auch von anderen Laboratorien bei der Untersuchung anderer Gewebe erhoben. So beschreibt Zalta eine"lösliche" RNA Polymeraseaktivität des zytoplasmatischen Überstandes (83), die zwar noch nicht gereinigt werden konnte, jedoch hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften,mit der hier beschriebenen Polymerase C übereinzustimmen scheint. Polya berichtete kürzlich über eine zytoplasmatische RNA Polymerase (84), jedoch ähnelt dieses Enzym hinsichtlich seines Molekulargewichts und des Verhaltens gegenüber α-Amanitin dem mitochondrialen Enzym.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß der direkte Beweis für die funktionellen Rollen der Kernpolymerasen A und B im einzelnen bisher ebenfalls nicht erbracht werden konnte, obwohl alle Befunde auf die nukleolare Funktion der Polymerase A und die Transkription des extranukleolaren Chromatins durch Polymerase B hindeuten.

## Zusammenfassung

Aus dem partikelfreien Zytoplasma von Rattenleberzellen wurde eine neue RNA Polymeraseaktivität isoliert, die, in Anlehnung an die Bezeichnung A und B für die Kernenzyme, "RNA Polymerase C" genannt wurde.
Das Enzym benötigt zur Synthese alle vier Nukleosidtriphosphate, eine DNA-Matritze und die Anwesenheit bivalenter Kationen; es besitzt damit die katalytischen Eigenschaften der klassischen RNA Polymerasen des Zellkerns. Eine Identität der Polymerase C mit einer Polynukleotidphosphorylase oder einer Terminalnukleotidtransferase konnte durch Untersuchungen mit Rifampicin und Actinomycin D und durch das hohe Molekulargewicht ausgeschlossen werden. Das chromatographische Verhalten und die ermittelten optimalen Synthesebedingungen des Enzyms zeigten eindeutig, daß Polymerase C weder mit den Kernenzymen A und B, noch mit der mitochondralen RNA Polymerase identisch ist. In diesem Zusammenhang stellt das Verhalten gegen α-Amanitin in vitro die beste Möglichkeit dar, das C-Enzym von den drei vorgenannten RNA Polymerasen zu differenzieren.
Eine möglicherweise durch die Aufarbeitung der Gewebe bedingte artefizielle Herkunft der zytoplasmatischen RNA Polymerase von den Kernenzymen konnte durch Experimente, in denen der natürliche Zustand dieser Enzyme vor der Extraktion fixiert wurde (α-Amanitin in vivo) oder durch Untersuchungen, in denen gereinigte Kernenzyme nachträglich den Bedingungen einer angenommenen Transformation unterworfen wurden, eindeutig ausgeschlossen werden.
Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung dieser zytoplasmatischen Polymerase ergaben, nach Teilhepatektomie, Ansatzpunkte für eine Synthesebeziehung zwischen der Polymerase C und den Kernpolymerasen A und B, wobei das C-Enzym möglicherweise als neu synthetisierte Vorstufe der Kernenzyme zu betrachten ist.

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Anti A | Antikörper gegen Kalbsthymus Polymerase A |
| Ci | Curie |
| CMP | Cytidinmonophosphat |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| cpm | Impulse pro Minute |
| DEAE- | Diäthylaminoäthyl |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| iDNA | "informational DNA" |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure |
| g | Erdbeschleunigung bei Zentrifugation |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| mA | Milli-Ampère |
| mS | Milli-Siemens |
| poly A, U,G,C | Synthetische Homoribopolymere der entsprechenden Nukleosidmonophosphate |
| POPOP | 2,2`-p-Phenylenbis-(5-phenyloxazol) |
| $PP_i$ | Pyrophosphat |
| PPO | 2,5-Diphenoloxazol |
| Rifampicin AF/013 | (3-formyl-rifamycin SV:o-n-octyoxim) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| hnRNA | Heterogenous nuclear RNA |
| mRNA | messenger-RNA |
| rRNA | ribosomale RNA |
| pre mRNA | prä messenger-RNA |
| tRNA | transfer RNA |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| S | Sedimentationskonstante |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TCA | Trichloressigsäure |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-aminomethan |
| TSS | Tris-Sucrose-Salz |
| UTP | Uridintriphosphat |

Literaturverzeichnis


1. Khesin R.B.; 1st Lepetit Colloquium Florence (1969) 167
2. Burgess R.R.,Travers A.A.,Dunn J.J. und Bautz E.K.F. Nature 221(1969) 43
3. Roberts J.W.; Nature 224(1969) 1168
4. Clark R.J. und Felsenfeld G.; Nature N.B. 229(1971) 101
5. Millette R.L.,Trotter C.D.,Herrlich P. und Schweiger M.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35(1970) 135
6. Itzhaki R.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 41(1970) 25
7. Jacob F. und Monod J.; J.Mol.Biol. 3(1961) 318
8. Meilhac M.,Tysper Z. und Chambon P.; Eur.J.Biochem. 28(1972) 291
9. Roeder R.G. und Rutter W.J.; Nature 224(1969) 234
10. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35(1970) 641-742
11. Kedinger C.,Gniazdowski M.,Mandel J.L.,Gissinger F. und Chambon P.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 38(1970) 165
12. Seifart K.H. und Sekeris C.E.; Z.Naturforsch. 24b(1969)1538
13. Roeder R.G. und Rutter W.J.; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 65(1970) 675
14. Butterworth P.,Fox R. und Chesterton J.; Eur.J.Biochem. 23(1971) 229
15. Juhasz P.P.,Benecke B.J. und Seifart K.H.; Febs.Lett. 27(1972) 30
16. Perry R.P.; Exptl.Cell Res. 29(1963) 400
17. Seifart K.H.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35(1970) 719
18. Stein H. und Hausen P.; Eur.J.Biochem. 14(1971) 270
19. Seifart K.H.,Juhasz P.P. und Benecke B.J.;Eur.J.Biochem. 33(1973) 181
20. Higashinakagawa T.,Onishi T. und Muramatsu M.; Biochem. Biophys.Res.Comm. 48(1972) 937
21. Kedinger C.,Nuret P. und Chambon P.; Febs Lett. 15(1971)169
22. ChestertonJ. und Butterworth P.; Febs Lett. 12(1971) 301
23. Gissinger F. und Chambon P.; Eur.J.Biochem. 28(1972) 277
24. Kedinger C. und Chambon P.; Eur.J.Biochem. 28(1972) 283
25. Reid B.D. und Parsons P.; Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 68(1971) 2830

26. Küntzel H. und Schäfer K.P.; Nature N.B. 231(1971) 265
27. Chauveau J.,Moulé Y. und Roiller C.; Exptl.Cell Res. 11(1956) 317
28. Seifart K.H. Benecke B.J. und Juhasz P.P.; Arch.Biochem. Biophys. 151(1972) 519
29. Weber K. und Osborn M.; J.Biol.Chem. 244(1969) 4406
30. Luck J.M.,Rasmussen P.S.,Satake K. und Tsvetikov A.N.; J.Biol.Chem. 233(1958) 1407
31. Lowry O.H.,Roserough N.J.,Farr A.L. und Randall J.R.; J.Biol.Chem. 193(1951) 265
32. Burton K.; Biochem.J. 62(1956) 315
33. Lentfer D. und Lezius A.G.; Eur.J.Biochem. 30(1972) 279
35. Akinrimisi E.O.,Benecke B.J. und Seifart K.H.; Eur.J. Biochem. zur Veröffentlichung eingereicht
34. Bray G.A.; Anal.Biochem. 1(1960) 279
36. Edwards G.S. und Wogan G.N.; Biochim.Biophys.Acta 224(1970) 597
37. Chambon P.; persönliche Mitteilung
38. Fiala E.S. und Davies F.F.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 18(1965) 115
39. Fukuhara H.; Biohcem.Biophys.Res.Comm. 18(1965) 297
40. de Kloet S.R.; Biochem.J. 99(1966) 566
41. Higashi K.,Matsukisa T., Kitao A. und Sakamoto Y.; Biochim.Biophys.Acta 166(1968) 388
42. Willems M.,Penman M. und Penman S.; J.Cell Biol. 41(1969) 177
43. Miyahara H.,Abe H. und Yamana K.; Biochem.Biophys.Res. Comm. 40(1970) 1070
44. Muramatsu M.,Shimada N. und Higashinakagawa T.; J.Mol.Biol. 53(1970) 91
45. Wanka F. und Schrauwen P.J.A.; Biochim.Biophys.Acta 254(1971) 237
46. Warner J.R., Girard M.,Latham H. und Darnell J.E.; J.Mol.Biol. 19(1966) 373
47. Yu F.L. und Feigelson P.; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 69(1972) 2833
48. Feigelson M.,Gross P.R. und Feigelson P.; Biochim. Biophys. Acta 55(1962) 495

49. Kenney F.T. und Kull F.J.; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 50(1963) 493
50. Kidson C. und Kirby K.S.; Nature 203(1964) 599
51. Barnabei O. und Sereni F.; Biochim.Biophys.Acta 91(1964) 239
52. Wicks W.D.,Greenman D.L. und Kenney F.T.; J.Biol.Chem. 240(1965) 4414
53. Tata J.R.; Progr.Nucl.Acid Res. 5(1966) 191
54. Sekeris C.E.; Proc. 3rd Intl.Congr.of Endocrinology, Mexico 1968
55. Jacob S.T.,Sajdel E.M. und Munro H.N.; Eur.J.Biochem. 7(1969) 449
56. Yu F.L. und Feigelson P.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 35(1969) 449
57. Hanoune J. unf Feigelson P.; Biochim.Biophys.Acta 199(1970) 214
58. Smuckler E.A. und Tata J.R.; Nature 234(1971) 37
59. Doenecke D.,Marmaras V.J. und Sekeris C.E.; Insect. Biochem (1973) in press
60. Barnabei O. und Ottolenghi C.; Advances in Enzym Regulation 6(1968) 189
61. Sajdel E.M. und Jacob S.T.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 45(1971) 707
62. Blatti S.P.,Ingles C.J.,Lindell T.J.,Morris P.W., Weaver R.F.,Weiberg F. und Rutter W.J. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 35(1970) 649
63. Chambon P.,Gissinger F.,Kedinger C.,Mandel J.L.,Meilhac M. und Nuret P.; Acta endocrinologica (Kbh.),Supplementum No.168 (1972) 222
64. Busch S.,ChambonP. und Mandel P.; Biochem.Biophys.Res. Comm. (1962) 255
65. Tsukada K. und Liebermann ;J.Biol. Chem. 240(1965) 1731
66. Tsukada K. und Liebermann ;J.Biol.Chem. 239(1964) 2952
67. Muramatsu M. und Busch H.; J.Biol.Chem. 240(1965) 3961
68. Pogo A.O.,Allfrey V.G. und Mirsky A.E.; Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 56(1966) 550
69. Pogo A.O.,Littau C.J.,Allfrey V.G. und Mirsky A.E.; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57(1967) 743

70. Bucher N.L.R. und Swaffield M.N.; Biochim.Biophys.Acta 174(1969) 491
71. Higgins G.M. und Anderson R.M.; Arch.Pathol. 12(1931) 186
72. Bell E.; Science 174(1971) 603
73. Krakow J.S. und Ochoa S.; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 49(1963) 88
74. Edmonds M. und Abrams R.; J.Biol.Chem. 237(1962) 2636
75. Gottesman M.E.,Cannelakis Z.N. und Cannelakis E.S.; Biochim.Biophys.Acta 61(1962) 34
76. Klemperer H.G.; Biochim.Biophys.Acta 95(1965) 251
77. Edmonds M.; J.Biol.Chem. 240(1965) 4621
78. Hardy S. und Kurland C.; Biochemistry 5(1966) 3668
79. Koch J. und v.Pfeil H.; Febs Lett. 17(1971) 312
80. Koch J.; persönliche Mitteilung
81. Benecke B.J.,Ferencz A. und Seifart K.H.; Febs Lett. 31(1973) 53
82. Raynaud-Jammet C., Catelli M.G. und Baulieu E.E.; Febs Lett. 22(1972) 93
83. Amalric F.,Nicoloso M. und Zalta J.-P.; Febs Lett. 22(1972) 67
84. Polya G.M.;Arch Biochem.Biophys. 155(1973) 125

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 15.2.1943 | geboren in Berlin als Sohn des Dipl.-Chemikers Dr.Joachim Benecke und seiner Ehefrau Helene, geb.Nawroth |
| 1949-1953 | Besuch der Volksschule I in Lüneburg |
| 1953-1963 | Besuch des Gymnasiums Johanneum in Lüneburg |
| 23.2.1963 | Reifeprüfung |
| 1963-1965 | Praktikantenzeit in der Hirsch-Apotheke Lüneburg |
| 6.9.1965 | Pharmazeutisches Vorexamen in Lüneburg |
| 1966-1969 | Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg |
| 3.4.1969 | Staatsexamen Pharmazie |
| 1969-1970 | Studium der Humanmedizin in Marburg |
| 25.9.1970 | Physikum Humanmedizin |
| 1.1.1971 | Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Physiologische Chemie in Marburg unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.K.H. Seifart |
| seit 24.10.1970 | verheiratet mit der Apothekerin Wiltrud Reusch |
| 3.7.1972 | Geburt unseres Sohnes |

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren: Böhme, Brück, Dimroth, Ebel, Ebert, Gallwitz, Golenhofen, Hartke, Hensel, Karlson, Kating, List, Neidlein, Nultsch, Petry, Rohen, Schmitz, Seifart, Seitz, Sekeris, Senger, Siess, v.Stosch, Unterhalt, Walcher, Wiegandt.